

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042789**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.03.24**

(51) Int. Cl. **C07K 14/415** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201892624**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.05.19**

### (54) РАСТЕНИЯ, ДАЮЩИЕ БЕССЕМЯНЫЕ ПЛОДЫ

(31) **16171462.1**

(32) **2016.05.26**

(33) **EP**

(43) **2019.06.28**

(86) **PCT/EP2017/062093**

(87) **WO 2017/202715 2017.11.30**

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

(72) Изобретатель:  
**Жирицотти Альберто (IT), Берентсен  
Рихард Бернард, Фрицен Хендрик  
Виллем (NL)**

(74) Представитель:  
**Беляева Е.Н. (BY)**

(56) DATABASE Geneseq [Online], 11 June 2007 (2007-06-11), "Arabidopsis thaliana SDS cDNA", XP002772148, retrieved from EBI accession no. GSN:AAD21310, Database accession no. AAD21310, shows 60% identity to present SEQ ID NO:5 and 17; sequence -& WO 01/74144 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; MA HONG [US]), 11 October 2001 (2001-10-11), the whole document  
WO-A1-2015136532

YIN ZHIMIN ET AL.: "TheDefH9-iaaM-containing construct efficiently induces parthenocarp in cucumber", CELLULAR & MOLECULAR BIOLOGY LETTERS, UNIVERSITY OF WROCAW. INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY, WROCAW; PL, PL, vol. 11, no. 2, 1 January 1901 (1901-01-01), pages 279-290, XP035994416, ISSN: 1425-8153, DOI: 10.2478/S11658-006-0024-4 [retrieved on 1901-01-01], the whole document

AZUMI YOSHITAKA ET AL.: "Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein", EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 21, no. 12, 17 June 2002 (2002-06-17), pages 3081-3095, XP002468372, ISSN: 0261-4189, DOI: 10.1093/EMBOJ/CDF285, cited in the application

DATABASE UniProt [Online], 7 January 2015 (2015-01-07), "SubName: Full=Uncharacterized protein {ECO:0000313|EMBL:KGN49611.1}";, XP002762418, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A0A0A0KPH6, Database accession no. A0A0A0KPH6, closest homolog to the present polypeptides, shows 74-100% identity to present SEQ ID NO: 2, 4, 6, and 12, respectively; sequence

YONG ZHANG ET AL.: "Characteristics of a novel malefemale sterile watermelon () mutant", SCIENTIA HORTICULTURAE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, XX, vol. 140, 27 March 2012 (2012-03-27), pages 107-114, XP028486868, ISSN: 0304-4238, DOI: 10.1016/J.SCI.2012.03.020 [retrieved on 2012-04-04]

(57) Изобретение относится к растениям, дающим бессемянные плоды. Изобретение также включает способы получения указанных растений и применение нуклеиновых кислот, кодирующих циклин-SDS-подобные белки, для получения бессемянных плодов.

**B1****042789****042789****B1**

Изобретение относится к бессемянным растениям. Настоящее изобретение также включает способы получения указанных растений и применение нуклеиновых кислот, кодирующих циклин-SDS-подобные белки для получения бессемянных плодов.

Большинство бессемянных плодов промышленного значения получено из растений, плоды которых, как правило, содержат несколько твердых семян относительно большого размера, которые распределены в мякоти плода. Известные растения с бессемянными плодами, например, включают арбуз, томат, огурец, баклажан, виноград, банан, цитрусовые растения, такие как апельсин, лимон и лайм. Из-за того, что потребление бессемянных плодов, как правило, проще и удобнее, они считаются более ценными.

Развитие плода обычно начинается, когда одна или несколько яйцеклеток в яйцевом аппарате цветка оплодотворяются ядрами спермиев из пыльцы.

Бессемянные плоды могут быть получены в результате двух различных явлений. В некоторых случаях плод развивается без оплодотворения семязачатка пыльцой; такое явление известно как "партенокарпия". В других случаях бессемянные плоды появляются после опыления, когда подавляется рост семян (зародыша и/или эндосперма), или семя рано умирает, в то время как остальная часть плода продолжает расти (стеноспермокарпия). В отличие от партенокарпии в стеноспермокарпии для начала развития плода требуется опыление.

Бессемянные плоды апельсина являются примером партенокарпии. Некоторые сорта апельсина (например, Навел (пупочный апельсин)) не производят жизнеспособной пыльцы. Однако они могут быть перекрестно опылены пыльцой других сортов. В случае, если в саду выращивается только мужской стерильный сорт, опыление не произойдет, и будут получены партенокарпические бессемянные плоды. Размножение соответствующих апельсиновых деревьев обычно осуществляется черенками с последующей прививкой к другому подвою.

Бессемянные бананы являются триплоидами. Несмотря на то что опыление в некоторых случаях может происходить обычным способом, большинство плодов не имеет семян. Это объясняется наличием нечетного числа наборов хромосом (3x), что приводит к неправильному расхождению хромосом во время мейоза и, как следствие, к образованию нежизнеспособной пыльцы. У триплоидных бананов также могут развиваться бессемянные плоды без оплодотворения. Даже когда происходит опыление, из трехсот плодов не более чем один плод может содержать несколько семян. Это может быть связано с тем, что триплоидная пыльца нежизнеспособна в силу причин, приведенных выше. Таким образом, банановые растения, в целом, можно рассматривать как партенокарпические. Банановые растения обычно размножаются бесполом путем от боковых побегов или пасынков у основания главного стебля, которые можно удалить и пересадить для получения потомства сорта. Сельхозпроизводители также размножают бананы с помощью тканевой культуры, в частности, таким образом можно получить материал, не зараженный какими-либо болезнями.

Бессемянные огурцы, тыквы и баклажаны являются примерами культур, которые могут давать бессемянные плоды без опыления (партенокарпия), например, в условиях, когда опыление затруднено (например, в условиях низких температур). Тем не менее, даже в этих условиях можно производить фрукты коммерческого качества. Однако после опыления все эти культуры могут давать плоды с семенами. Поэтому эти культуры являются условно партенокарпическими. Размножение сельскохозяйственных культур может осуществляться путем самоопыления или перекрестного опыления, размножения *in vitro* и прививки.

В отношении томатных мутантов также известно, что они могут давать бессемянные плоды в условиях, когда нормальное опыление/оплодотворение затруднено (например, в условиях низких температур). Таким образом, эти культуры также являются условно партенокарпическими. Известно, что этот фенотип проявляется у мутантов системы *pat*, *pat-2* и *pat-3/pat-4*. Гены, лежащие в основе этих мутаций, неизвестны, и система *pat-3/pat-4*, по-видимому, зависит от нескольких локусов.

Партенокарпия также была введена в несколько видов растений с помощью генетической модификации. Экспрессия бактериальной триптофанмонооксигеназы (*iaaM*), обеспечивающей синтез ауксина под контролем промотора *DefH9*, специфичного для семязачатка и плаценты, вызывала партенокарпию огурцов (Yin et al., 2006, Clular & molecular Biotech. Letters 11, 279-290), баклажана (Acciardi et al., 2002, BMC Biotech. 2(4)), томата (Rotino et al., 2005, BMC Biotech. 5(32)) и табака.

Эти трансгенные растения демонстрируют важность растительных гормонов для развития семян и плодов. Специалистам хорошо известно, что развитие семян и плодов, помимо других факторов, в значительной степени контролируется несколькими растительными гормонами. Партенокарпия, включая логические последствия бессемянности плодов, также может быть вызвана, например, путем экзогенного применения растительных гормонов, в частности, ауксина или гиббереллина (Ruan et al., Trends in Plant Sci. 17(11), 1360-1385).

Примерами стеноспермокарпических культур являются выращиваемые селекционерами бессемянные арбузы. Обычные арбузные растения диплоидны (2n). Арбузы, дающие бессемянные плоды, - это гибриды, полученные скрещиванием диплоидного (2n) мужского арбуза с тетраплоидным (4n) женским арбузом. Полученные гибридные семена F1 являются триплоидными (3n). Для начала завязывания плодов на гибридных растениях F1 требуется опыление. Из-за того что триплоидные (3n) гибриды F1 не

производят фертильную пыльцу, на одном поле с ними должны выращиваться так называемые растения-опылители. Эти растения-опылители диплоидны ( $2n$ ). Как правило, для получения достаточного количества пыльцы для опыления всех гибридов F1 в этой схеме должно быть обеспечено отношение опылителей к гибридам, равное примерно 1:3. Перекрестное опыление между диплоидным ( $2n$ ) опылителем и цветками женского триплоидного ( $3n$ ) гибридного растения приводит к завязыванию плодов, после чего на триплоидном гибридном растении происходит образование бессемянных триплоидных плодов. Диплоидные ( $2n$ ) и тетраплоидные ( $4n$ ) родители гибридов F1 дают плоды с семенами, и такие растения могут размножаться независимо друг от друга путем самоопыления.

Бессемянный виноград может быть получен как из партенокарпических, так и стеноспермокарпических сортов. Сорт Black Corinth является партенокарпическим, тогда как Sultanina является стеноспермокарпическим. Виноградные растения, как правило, размножаются с помощью черенков и последующей их прививки к другому подвою.

Одним из факторов, приводящих к получению растений с бессемянными плодами, могут быть нарушения в мейозе. Пример растений, дающих бессемянные плоды, приведен в работе Zhang et al. (2012, *Scientia Horticulture* 140, 107-114), в которой описаны бессемянные арбузы. Мутант с мужской и женской стерильностью (MFS) был получен из потомка F1-гибрида после воздействия на его семена гамма-излучением. Пыльца от мутанта MFS была полностью нежизнеспособной. Растения MFS дают бессемянные плоды при опылении пыльцой растений с мужской фертильностью. Поэтому арбуз MFS можно классифицировать как стеноспермокарпический. Семязачатки также были практически полностью нежизнеспособными, так как при перекрестном опылении мутантов MFS пыльцой с разных растений с мужской фертильностью семена практически не возникали. У мутанта MFS наблюдались неполный синапс и аномальное разделение хроматид во время мейоза, это считается причиной мужской и женской стерильности. Гены, ответственные за эффекты, присутствующие в мутанте MFS, не были идентифицированы, однако представляется вероятным, что фенотип в мутанте MFS обусловлен одним рецессивным геном.

В работе Pradillo et al. (2014, *Frontiers in Plant Sci.* 5, Article 23, doi: 10.3389/fpls.2014.00023) приведен обзор научных знаний о генах, которые участвуют в гомологичной рекомбинации во время мейоза в *Arabidopsis*.

В работе Azumi et al. (2002, *EMBO J.* 21(12), 3081-3095) описано выделение мутанта *Arabidopsis* с дефектами синапса и образованием бивалентов в мужском мейозе, а также другие подобные дефекты, хотя и в меньшей степени, в женском мейозе. Эта мутация была названа "Solo Dancers" (sds), было доказано, что ее причиной является один рецессивный ген. SDS мутанты являются мутантами с мужской стерильностью, у которых также имеются сильные нарушения в женской фертильности. Растения, гомозиготные по мутации sds, являются растениями с мужской стерильностью, однако, по меньшей мере, в незначительной степени они обладают женской фертильностью, что было продемонстрировано путем перекрестного опыления мутанта sds пыльцой растений с мужской фертильностью. Таким образом, SDS мутанты являются мутантами с мужской стерильностью, у которых также имеются сильные нарушения в женской фертильности. Было идентифицировано, что ген sds принадлежит к генам, кодирующим белок циклинового типа, и было показано, что он взаимодействует с белками CDK, Cdc2a и Ccdc2b *Arabidopsis*. Тем не менее, SDS был идентифицирован как новый, ранее неизвестный белок циклинового типа. В работе De Muyl et al. (2009, *PLOS genet.* 5(9) e1000654, doi: 10.1371/journal.pgen.1000654) подтверждается, что мутант sds *Arabidopsis* имеет рекомбинационный дефект в мейозе, и предполагается, что этот дефект вызван неправильным распределением другого белка (AtDMC1) в клетках во время мейоза.

Из приведенного выше пояснения очевидно, что в природе существует много факторов, определяющих то, дают ли растения бессемянные плоды, и что такие факторы могут быть обусловлены несколькими причинами, например морфологическими, физиологическими и/или генетическими.

Для получения бессемянных плодов в стеноспермокарпических культурах опылению должна подвергаться женская часть цветка растения. Стеноспермокарпические культуры, выращиваемые в настоящее время, являются растениями с мужской стерильностью. Как следствие, помимо женского растения, в том же поле должно выращиваться другое растение с мужской фертильностью (опылитель). Из-за того, что площадь, на которой выращивают растения-опылители, обеспечивается за счет площади, на которой выращивают женские растения, дающие бессемянные плоды, урожайность на единицу обрабатываемой площади снижается. Как правило, растения-опылители являются обычными растениями, которые также могут самоопыляться. Однако плоды растений-опылителей дают семена. У арбуза растения-опылители обычно являются диплоидными ( $2n$ ), которые при самоопылении дают плоды с семенами; такие плоды в некоторых случаях также можно собирать и продавать отдельно (см. WO 2012069539). По коммерческим причинам эти плоды с семенами растений-опылителей нельзя смешивать с бессемянными плодами. Следовательно, до или после сбора урожая необходимо отделять бессемянные плоды от плодов с семенами; это приводит к тому, что машинная уборка урожая является невозможной или требует значительных усилий или дополнительной стадии обработки после сбора урожая. Эти дополнительные меры увеличивают производственные затраты при получении бессемянных плодов. Кроме того, растения-опылители должны цвести и производить достаточное количество жизнеспособной пыльцы в одно время с тем, ко-

гда цветки женского растения и его дыхальце способны принимать пыльцу для начала завязывания плода. Таким образом, время цветения и время оплодотворения для растения-опылителя должно соответствовать времени цветения и времени оплодотворения женского растения, дающего бессемянные плоды. Если время цветения растения-опылителя и соответствующего женского растения недостаточно синхронизировано, опыление происходить не будет или будет происходить лишь в недостаточном количестве случаев. Вследствие этого стеноспермокарпным женским растением производится меньшее количество плодов. Кроме того, специалистам известно, что климатические условия, такие как дождь, жара и т.д., могут влиять на выработку пыльцы растения-опылителя иначе, чем время плодородия дыхальца женского растения, отличающегося генотипом. Следовательно, климатические условия также могут привести к несовпадению времени фертильности опылителей и женских растений, что приводит к снижению урожайности.

Эти недостатки не относятся к растениям по изобретению, описанным в настоящем документе.

Таким образом, целью настоящего изобретения является устранение недостатков растений, дающих бессемянные плоды, выращиваемых в настоящее время.

В популяции мутагенизированных диплоидных растений арбуза M2 наблюдалось растение, производящее бессемянные плоды. Это мутантное растение было обозначено как EMB1. Неожиданно было обнаружено, что пыльца указанного растения может быть использована для обратного скрещивания. Таким образом, в отличие от известных растений, производящих бессемянные плоды, растения, описанные в настоящем документе, являются растениями с мужской фертильностью. Осуществлялось самоопыление потомства, полученного в результате обратного скрещивания, при этом 25% полученных растений давали бессемянные плоды. Был идентифицирован мутантный аллель (*emb1*), который обеспечивал фенотип бессемянных плодов, т.е. когда диплоидные растения, гомозиготные по *emb1* (*emb1/emb1*), после самоопыления, либо опыления пыльцой из другого растения, давали бессемянные диплоидные плоды. Таким образом, фенотип бессемянных плодов встречается у растений, гомозиготных по рецессивной мутации в аллеле *emb1*. Белок дикого типа, кодируемый аллелем дикого типа, соответствующим мутантному аллелю *emb1* по изобретению, имеет некоторые сходства, но и существенные различия с циклин-SDS-белками, поэтому он получил название "циклин-SDS-подобный белок". Идентичность последовательности между циклин-SDS-белком и его кодирующими нуклеотидными последовательностями, известными специалистам, и соответствующими последовательностями циклин-SDS-подобных белков, описанными в настоящем изобретении, является низкой. Что касается фенотипического эффекта у растений, известные специалистам растения с мутацией в циклин-SDS-подобном белке имеют фенотип с мужской стерильностью, тогда как растения, описанные в настоящем изобретении, с мутацией в циклин-SDS-подобном белке, являются растениями с мужской фертильностью.

Первый вариант осуществления настоящего изобретения относится к растениям, клеткам растений и частям растений, отличающимся тем, что такие растения и клетки растений обладают пониженной активностью циклин-SDS-подобного белка по сравнению с растениями и клетками растений, содержащими функциональный циклин-SDS-подобный белок дикого типа.

В контексте настоящего изобретения выражение "циклин-SDS-подобный белок" означает белок, при снижении активности которого или при нокауте экспрессии которого в растении в растении (например, в растении, гомозиготном по мутантной нуклеотидной последовательности, кодирующей циклин-SDS-подобный белок) будет получена пыльца с мужской фертильностью, и при этом будет обеспечено образование бессемянных плодов при самоопылении указанного растения.

В контексте настоящего изобретения "сниженная активность" белка означает уменьшение активности циклин-SDS-подобного белка по сравнению с соответствующей клеткой растения дикого типа или соответствующим растением дикого типа. В одном аспекте "снижение" включает полный нокаут экспрессии генов или обеспечение потери функции или циклин-SDS-подобный белок с пониженной функцией, например, усеченный SDS-подобный белок может полностью утратить функцию или иметь сниженную функцию. Снижение активности может означать уменьшение экспрессии гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок (что также называется "нокдаун"), или нокаут экспрессии гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, и/или уменьшение количества циклин-SDS-подобного белка в клетках или уменьшение функции, или потерю функции в отношении ферментативной активности циклин-SDS-подобных белков в клетках.

Под "нокаутом" или "полным нокаутом" подразумевается, что экспрессия соответствующего гена более не поддается обнаружению.

"Потеря функции (в отношении ферментативной активности)" в контексте настоящего изобретения означает, что белок, хотя и присутствует в количествах, равных или близких к соответствующему белку дикого типа, больше не обеспечивает соответствующий эффект, т.е. когда мутантные аллели присутствуют в гомозиготной форме в диплоидном растении, растение является растением с мужской фертильностью, однако при опылении дает только бессемянные плоды. Термины "нефункциональный" и "потеря активности" имеют то же значение, что и "потеря функции". В настоящем документе все три термина используются взаимозаменяемо. Таким образом, когда речь идет о циклин-SDS-подобном гене, кодирующем нефункциональный белок, это означает, что ген может быть экспрессирован, однако кодиру-

ный белок не является функциональным, например, из-за того, что белок усечен или содержит одну или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций по сравнению с SDS-подобным белком дикого типа.

"Снижение функции (в отношении ферментативной активности)" или "уменьшение функции" в контексте настоящего изобретения означает, что белок, хотя и присутствует в количествах, равных или близких к соответствующему белку дикого типа, больше не обеспечивает соответствующий эффект, т.е. когда он присутствует в гомозиготной форме в диплоидном растении, растение является растением с мужской фертильностью, однако при опылении дает только бессемянные плоды.

Термин "консервативный домен" относится к консервативным белковым доменам, таким как домены Cyclin\_N (pfam00134) и Cyclin\_C domains (pfam02984). Эти домены могут, например, внесены в базу данных консервативных доменов NCBI (адрес: [ncbi.nlm.nih.gov/cdd](http://ncbi.nlm.nih.gov/cdd)).

Термины "поколение M1" или "растения M1" в контексте настоящего изобретения относятся к первому поколению, которое получают непосредственно в результате мутагенной обработки. Представителем поколения M1, например, является растение, выращенное из семян, обработанных мутагеном.

В настоящем документе термины "поколение M2" или "растение M2" относятся к поколению, полученному в результате самоопыления поколения M1. Растение, выращенное из семян, полученных в результате самоопыления растения M1, представляет собой растение M2.

Снижение экспрессии может, например, быть определено путем измерения количества РНК-транскриптов, кодирующих циклин-SDS-подобные белки, например, с использованием нозерн-блоттинга или ОТ-ПЦР. В данном контексте "уменьшение" предпочтительно означает уменьшение количества транскриптов по меньшей мере на 50%, в частности по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, особенно предпочтительно по меньшей мере на 95%.

Уменьшение количества циклин-SDS-подобного белка, которое приводит к снижению активности этих белков в целевых растениях или в клетках растения, может быть определено, например, иммунологическими методами, такими как вестерн-блоттинг, ELISA (ферментный иммуносорбентный анализ) или RIA (радиоиммунный анализ). В данном контексте "снижение" предпочтительно означает уменьшение количества циклин-SDS-подобных белков по меньшей мере на 50%, в частности по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, особенно предпочтительно по меньшей мере на 95%.

Способы получения антител, которые специфически реагируют с указанным белком, т.е. которые специфически связываются с указанным белком, известны специалистам (смотрите, например, Lottspeich and Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Производство таких антител предлагается, на контрактной основе, в качестве услуги несколькими фирмами.

В контексте настоящего изобретения снижение активности циклин-SDS-подобного белка в растении по изобретению также может быть определено по фенотипу растения. Растения, гомозиготные по мутантному аллелю, кодирующему циклин-SDS-подобный белок, или обладающие сниженной активностью циклин-SDS-подобного белка, дают бессемянные плоды и являются растениями с мужской фертильностью (производят жизнеспособную пыльцу).

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения сниженная активность белка, имеющего функцию циклин-SDS-подобного белка, в растениях или в клетках растений по изобретению является сниженной по сравнению с соответствующими растениями или клетками растений дикого типа.

В контексте настоящего изобретения термин "клетка растения дикого типа" или "растение дикого типа" означает, что рассматриваемые клетки растений или растения использовались в качестве исходного материала для производства клеток растений или растений по изобретению, т.е. их генетическая информация соответствует генетической информации клетки растения или растений по изобретению (за исключением введенных (генетических) модификаций или мутаций). В одном аспекте растение дикого типа или клетка растения дикого типа представляет собой растение, содержащее полностью функциональный циклин-SDS-подобный белок, например (для растений или клеток арбуза) - диплоидное арбузное растение, продуцирующее белок SEQ ID NO: 2 и производящее плоды с семенами при самоопылении, или (для растений или клеток дыни) - диплоидное растение дыни, продуцирующее белок SEQ ID NO: 6, или (для растений или клеток огурца) - диплоидное растение огурца, продуцирующее белок SEQ ID NO: 12, или (для растений или клеток томата) - диплоидное растение томата, продуцирующее белок SEQ ID NO: 19, или (для растений или клеток перца) - диплоидное растение, продуцирующее белок SEQ ID NO: 20.

В контексте настоящего изобретения термин "соответствующий" означает, что при сравнении нескольких объектов такие сравниваемые объекты находятся в одинаковых условиях. В контексте настоящего изобретения термин "соответствующий" в отношении клеток растения дикого типа или растений дикого типа означает, что сравниваемые клетки растений или растения выращивались в одинаковых условиях культивации, что они одного (культивационного) возраста использовались в качестве исходного материала для производства клеток растений, и что их генетическая информация соответствует генетической информации клетки растения или растений по изобретению (за исключением введенных (генетических) модификаций или мутаций). При сравнении нуклеотидных последовательностей молекул РНК и ДНК, или если указано, что такие последовательности соответствуют друг другу, специалистам известно,

что тимин (Т) в молекуле ДНК соответствует урину (U) в молекуле РНК. Таким образом, подразумевается, что при сравнении этих последовательностей Т в последовательности ДНК заменяется U в последовательности РНК и наоборот.

Предпочтительно в вариантах осуществления настоящего изобретения циклин-SDS-подобный белок растения, клетки растения или части растения дикого типа кодируется молекулами нуклеиновых кислот, выбранными из группы, состоящей из:

а) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белок с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 2 (циклин-SDS-подобный белок арбуза) или SEQ ID NO: 6 (циклин-SDS-подобный белок дыни), или SEQ ID NO: 12 (циклин-SDS-подобный белок огурца), или SEQ ID NO: 19 (циклин-SDS-подобный белок *Solarium lycopersicum*), или SEQ ID NO: 20 (циклин-SDS-подобный белок *Capsicum annuum*);

б) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белок, последовательность которого имеет идентичность по меньшей мере 58% или по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90%, или особенно предпочтительно по меньшей мере 95% с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 12, или SEQ ID NO: 19, или SEQ ID NO: 20;

с) молекул нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеотидную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 17 или их комплементарную последовательность;

д) молекул нуклеиновых кислот, которые имеют идентичность по меньшей мере 58% или по меньшей мере 60% предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% или особенно предпочтительно по меньшей мере 95% с нуклеотидными последовательностями, описанными под пунктом с);

е) молекул нуклеиновых кислот, которые гибридизируют по меньшей мере с одной нитью молекул нуклеиновых кислот, описанных в пунктах а), б), с) или д) в жестких условиях;

ф) молекул нуклеиновых кислот, нуклеотидная последовательность которых отличается от последовательности молекул нуклеиновых кислот, описанных в пунктах а), б), с) или д), вследствие вырожденности генетического кода; и

г) молекул нуклеиновых кислот, которые представляют фрагменты, аллельные варианты и/или производные молекул нуклеиновых кислот, описанных в пунктах а), б), с) или д).

Геномная нуклеотидная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 1, и кодирующая последовательность, указанная в SEQ ID NO: 1, кодируют циклин-SDS-подобный белок *Citrullus lanatus* (арбуз), имеющий аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 5 означает кодирующую последовательность, которая кодирует циклин-SDS-подобный белок дикого типа из *Cucumis melo* (дыня) с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 6. SEQ ID NO: 12 означает циклин-SDS-подобный белок дикого типа из *Cucumis sativus* (огурец). SEQ ID NO: 19 означает циклин-SDS-подобный белок дикого типа из *Solarium lycopersicum* (томат). SEQ ID NO: 20 означает циклин-SDS-подобный белок дикого типа из *Capsicum annuum* (перец).

Клетки растений, части растений или растения по изобретению могут представлять собой клетки растений любых видов или растения любых видов. Клетки растений по изобретению могут быть клетками однодольных или двудольных растений. Растения по изобретению могут быть однодольными или двудольными. Предпочтительно клетки растений по изобретению представляют собой клетки овощных растений (клетки овощей), или растения представляют собой овощные растения, в частности овощи, такие как томат, лук, лук-порей, чеснок, морковь, перец, спаржа, артишок, сельдерей, огурец, дыня, тыква бутылочная, тыква крупноплодная, салат-латук, арбуз, шпинат, капуста (*Brassica oleracea*), маш-салат, баклажаны и бамя. Более предпочтительными являются клетки овощей (клетки овощных растений) или овощные растения из семейства *Cucurbitaceae* или семейства *Solanaceae*. Наиболее предпочтительные клетки растений и растения по изобретению включают клетки или растения тыквы (*Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Lagenaria siceraria*), дыни (*Cucumis melo*), огурца (*Cucumis sativus*), арбуза (*Citrullus lanatus*), томата (*Solarium lycopersicum*) или перца (*Capsicum annuum*), особенно предпочтительными являются клетки растений арбуза (*Citrullus lanatus*) или дыни (*Cucumis melo*), или арбуза (*Citrullus lanatus*) или дыни (*Cucumis melo*). В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения растения и клетки растений представляют собой культивируемые растения этих видов, например, инбредные линии или сорта с хорошими агрономическими характеристиками, в частности растения, которые могут использоваться для получения сельскохозяйственной продукции, имеющей рыночную ценность (например, фруктов), хорошего качества и однородности.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к растениям и частям растений, содержащим клетки растений по изобретению.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к клетке растения или к растению, которые отличаются тем, что в такой клетке растения или растении активность циклин-SDS-подобного белка снижена по сравнению с соответствующим растением или клеткой растения дикого типа, при этом циклин-SDS-подобный белок соответствующего растения или клетки растения дикого типа кодируется молекулами нуклеиновых кислот, выбранными из группы, состоящей из:

а) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белок с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 2 (циклин-SDS-подобный белок арбуза) или SEQ ID NO: 6 (циклин-SDS-подобный белок дыни), или SEQ ID NO: 12 (циклин-SDS-подобный белок огурца), или SEQ ID NO: 19 (циклин-SDS-подобный белок *Solatum lycopersicum*), или SEQ ID NO: 20 (циклин-SDS-подобный белок *Capsicum annuum*);

б) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белок, последовательность которого имеет идентичность по меньшей мере 58% или по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% или особенно предпочтительно по меньшей мере 95% с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 12, или SEQ ID NO: 19, или SEQ ID NO: 20;

с) молекул нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеотидную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 17, или их комплементарную последовательность;

д) молекул нуклеиновых кислот, которые имеют идентичность по меньшей мере 58% или по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% или особенно предпочтительно по меньшей мере 95% с нуклеотидными последовательностями, описанными под пунктом с);

е) молекул нуклеиновых кислот, которые гибридизируют по меньшей мере с одной нитью молекул нуклеиновых кислот, описанных в пунктах а), б), с) или д) в жестких условиях;

ф) молекул нуклеиновых кислот, нуклеотидная последовательность которых отличается от последовательности молекул нуклеиновых кислот, описанных в пунктах а), б), с) или д), вследствие вырожденности генетического кода; и

г) молекул нуклеиновых кислот, которые представляют фрагменты, аллельные варианты и/или производные молекул нуклеиновых кислот, описанных в пунктах а), б), с) или д).

"Идентичность последовательности" и "сходство последовательности" можно определить путем выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритмов глобального или локального выравнивания. Таким образом, последовательности могут именоваться "существенно идентичными" или "с существенной идентичностью", когда они имеют определенный общий минимальный процент идентичности последовательности (в соответствии с определением ниже) при оптимальном выравнивании с использованием программных средств GAP или BESTFIT или программы Needle (пакет Emboss) с параметрами по умолчанию, см. ниже. Эти программы используют алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей длине, получая максимальное количество совпадений и сводя к минимуму количество делеций. Обычно используются параметры по умолчанию, штраф на внесение делеций = 10, штраф на продолжение делеций = 0,5 (как для выравнивания нуклеотидных последовательностей, так и выравнивания последовательностей белков). Для нуклеотидов по умолчанию используется матрица замен DNAFULL, а для белков - Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 10915-10919). Выравнивания последовательности и показатели процента идентичности последовательности, например, могут быть определены с помощью компьютерных программ, таких как EMBOSS, которая доступна по адресу: [ebi.ac.uk/Tools/emboss/](http://ebi.ac.uk/Tools/emboss/). В качестве альтернативы сходство или идентичность последовательности может определяться путем поиска в базах данных (например, EMBL, GenBank), с использованием известных алгоритмов и форматов вывода результатов, таких как FASTA, BLAST и т.д., однако для сравнения идентичности последовательности совпадения должны быть получены и приведены в соответствие парно. Два белка или два белковых домена или две нуклеотидные последовательности имеют "существенную идентичность последовательности", если процент идентичности последовательности составляет по меньшей мере 58, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99% или более (в соответствии с определением для программы Needle (пакет Emboss) с использованием параметров по умолчанию, т.е.: штраф на внесение делеции = 10, штраф на продолжение делеции = 0,5, с использованием матрицы замен DNAFULL для нуклеиновых кислот и Blosum62 для белков). В настоящем документе такие последовательности также называются "вариантами" или "аллельными вариантами" или "производными". Могут быть идентифицированы другие аллельные варианты генов/аллелей, кодирующих циклин-SDS-подобные белки, и другие циклин-SDS-подобные белки, помимо специфических нуклеотидных последовательностей и белков, описанных в настоящем документе. Таким образом, например, циклин-SDS-подобные белки, имеющие существенную идентичность последовательности с белком SEQ ID NO: 2 или с белком SEQ ID NO: 6, или с белком SEQ ID NO: 12, или с белком SEQ ID NO: 18, или с белком SEQ ID NO: 19, являются вариантами указанного белка.

Аллельные варианты могут присутствовать в других культивируемых овощных растениях или клетках других овощных растений, в частности в овощах, таких как томат, лук, лук-порей, чеснок, морковь, перец, спаржа, артишок, тыква бутылочная, тыква крупноплодная, сельдерей, огурец, дыня, салат-латук, арбуз, шпинат, виды рода капуста (*Brassica*), маш-салат и бамя. Мутации в таких аллельных вариантах гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, имеют одинаковый эффект на мужскую и женскую фертильность и образование бессемянных плодов у других овощных растений. В частности, аллельные варианты циклин-SDS-подобного гена могут присутствовать в клетках растений или растений

семейства Cucurbitaceae, таких как дыня (*Cucumis melo*), огурец (*Cucumis sativus*), арбуз (*Citrullus lanatus*), тыква крупноплодная (*Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Lagenaria siceraria*), особенно предпочтительные аллельные варианты циклин-SDS-подобного гена могут присутствовать в клетках растений арбуза (*Citrullus lanatus*), дыни (*Cucumis melo*) или огурца (*Cucumis sativus*) или в растениях арбуза (*Citrullus lanatus*) или дыни (*Cucumis melo*) или огурца (*Cucumis sativus*). Кроме того, аллельные варианты циклин-SDS-подобного гена могут также существовать в или клетках растений семейства Solanaceae, таких как томат (*Solanum lycopersicum*), или диких растений, родственных томату (*S.pimpinelli*, *S.cheesmaniae*, *S.galapagense*, *S.pimpinellifolium*, *S.chmielewskii*, *S.habrochaites*, *S.neorickii* и *S.pennelli*, *S.arcanum*, *S.chilense*, *S.corneliomulleri*, *S.huaylasense*, и *S.peruvianum*), перцу (*Capsicum annuum*), *Solanum melongena* (баклажан), *Solanum tuberosum* (картофель) и т.д.

Аллельные варианты также могут присутствовать в других культурных растениях, таких как полевые культуры (например, виды рода *Brassica*, кукуруза, рис, соя, пшеница, ячмень, хлопок, табак, кофе и т.д.) или фруктовые культуры (например, виноград, яблоко, слива, цитрусовые, клубника и т.д.).

Отмечено, что циклин SDS-подобные белки Cucurbitaceae имеют между собой высокую идентичность последовательностей (по меньшей мере 70% для предоставленных последовательностей), и циклин-SDS-подобные белки Solanaceae также имеют высокую идентичность последовательностей. С другой стороны, идентичность последовательностей между последовательностями Cucurbitaceae и Solanaceae невелика (40% или менее), см. табл. А ниже.

Таблица А. Идентичность последовательности циклин-SDS-подобного белка (попарное выравнивание с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша)

|                           | Арбуз<br>(SEQ ID<br>NO: 2) | Дыня<br>(SEQ ID<br>NO: 6) | Огурец<br>(SEQ ID<br>NO: 12) | Томат<br>(SEQ ID<br>NO: 19) | Перец<br>(SEQ ID<br>NO: 20) |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Арбуз<br>(SEQ ID NO: 2)   | 100%                       | 73%                       | 70%                          | 34%                         | 32%                         |
| Дыня<br>(SEQ ID NO: 6)    |                            | 100%                      | 86%                          | 40%                         | 38%                         |
| Огурец<br>(SEQ ID NO: 12) |                            |                           | 100%                         | 40%                         | 37%                         |
| Томат<br>(SEQ ID NO: 19)  |                            |                           |                              | 100%                        | 81%                         |
| Перец<br>(SEQ ID NO: 20)  |                            |                           |                              |                             | 100%                        |

"Жесткие условия гибридизации" используются для идентификации нуклеотидных последовательностей, которые существенно идентичны определенной нуклеотидной последовательности. Жесткость условий зависит от определенной последовательности и в различных случаях будет различной. Обычно жесткие условия означает следующее: температура составляет на 5°C ниже точки плавления ( $T_m$ ) для определенной последовательности при определенной ионной силе и pH.  $T_m$  - это температура (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% целевой последовательности гибридизуется с подобранным зондом. Обычно строгие условия будут выбраны таким образом, что концентрация солей составляет приблизительно 0,02 моль при pH 7 и температуре по меньшей мере 60°C. Снижение концентрации солей и/или повышение температуры увеличивает жесткость условий. Жесткие условия для РНК-ДНК гибридизации (нозерн-блоттинг с использованием, например, зонда длиной 100 нуклеотидов) представляют собой, например, такие условия, которые включают по меньшей мере одну промывку в  $0,2 \times SSC$  при 63°C в течение 20 мин, или эквивалентные условия. Жесткие условия для ДНК-ДНК гибридизации (Саузерн-блоттинг с использованием, например, зонда длиной 100 нуклеотидов) представляют собой, например, такие условия, которые включают по меньшей мере одну промывку (как правило, две промывки) в  $0,2 \times SSC$  по меньшей мере при 50°C, как правило, приблизительно, 55°C, в течение 20 мин или эквивалентные условия. См. также Sambrook et al. (1989) и Sambrook and Russell (2001).

Снижение активности циклин-SDS-подобного белка в растениях или клетках растений по изобретению также может быть достигнуто путем генного сайленсинга.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения сниженная активность циклин-SDS-подобного белка в растениях или клетках растений по изобретению обеспечивается путем генного сайленсинга.

Растения и клетки растений по настоящему изобретению со сниженной активностью циклин-SDS-подобного белка могут быть получены с использованием различных известных специалистам способов,

обеспечивающих эффект генного сайленсинга. Такие способы включают, например, экспрессию соответствующей антисмысловой РНК или двухцепочечного РНК-конструкта (технология РНК-интерференции), предоставление молекул или векторов нуклеиновой кислоты, которые передают эффект косупрессии, экспрессию сконструированного соответствующим образом рибозима, который расщепляет определенные транскрипты, которые кодируют циклин-SDS-подобный белок.

Снижение активности циклин-SDS-подобного белка в растениях или клетках растений по изобретению может обеспечиваться путем экспрессии антисмысловой последовательности в соответствующих растениях или клетках растений.

Снижение активности циклин-SDS-подобного белка в растениях или клетках растений по изобретению может обеспечиваться путем одновременной экспрессии молекул смысловой и антисмысловой РНК (технология РНК-интерференции) соответствующего целевого гена, репрессия которого должна осуществляться, предпочтительно гена или аллеля, кодирующего циклин-SDS-подобный белок.

Кроме того, известно, что в полевых условиях образование двухцепочечных молекул РНК промоторных последовательностей может приводить к транскриптивному метилированию и транскрипционной инактивации гомологических копий этого промотора (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). Снижение активности циклин-SDS-подобного белка в растениях или клетках растений по изобретению может обеспечиваться путем одновременной экспрессии молекул смысловой и антисмысловой РНК (технология РНК-интерференции) промоторных последовательностей, инициирующих транскрипцию соответствующего целевого гена, репрессия которого должна осуществляться, предпочтительно гена или аллеля, кодирующего циклин-SDS-подобный белок.

Также, описаны рибозимы, которые снижают экспрессию белков путем расщепления молекулы РНК, кодирующей целевой ген.

Ниже в настоящем документе будет приведено дополнительное обсуждение соответствующих технологий сайленсинга генов, известных специалисту, которые применимы к клеткам растений или растениям по изобретению, соответственно.

"Эффект генного сайленсинга" относится к понижающей регуляции или полному подавлению экспрессии целевого гена или семейства генов. Клетки растений или растения после их сайленсинга продуцируют меньшее количество пригодных для трансляции транскриптов (включая мРНК) для соответствующего целевого гена или аллеля по сравнению с соответствующими клетками растений дикого типа или соответствующими растениями дикого типа. Такие меньшие количества пригодных для трансляции транскриптов (включая мРНК) могут быть обусловлены нацеленной деградацией соответствующих транскриптов.

"Целевой ген или аллель" означает ген или аллель, или семейство генов (или один или несколько специфических аллелей гена), которые подлежат модуляции для того, чтобы организм (например, клетка растения или растение) приобрел необходимый фенотип. Для растений с мужской стерильностью, которые дают бессемянные плоды, например, целевыми генами или целевыми аллелями являются гены, кодирующие циклин-SDS-подобный белок.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения сниженная активность циклин-SDS-подобного белка в растениях или клетках растений по изобретению обеспечивается с использованием способов иммуномодуляции.

Еще один возможный способ снижения ферментативной активности белков в растениях или в клетках растений - это так называемый метод иммуномодуляции. Известно, что экспрессия антител *in planta*, которые специфически распознают белок растения, приводит к снижению активности соответствующих белков. Ниже в настоящем документе будет приведено дополнительное обсуждение соответствующих технологий, известных специалисту.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к клеткам растений или растениям, отличающимся тем, что они содержат мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, может присутствовать в гомозиготном или гетерозиготном состоянии. В соответствии с одним аспектом изобретения мутантный аллель кодирует циклин-SDS-подобный белок со сниженной функцией или с потерей функции кодированного мутантного белка. Мутантный аллель может кодировать белок с заменой, вставкой или удалением одной или нескольких аминокислот, в результате чего функция белка снижена или в белке имеется потеря функции по сравнению с белком дикого типа (функциональным). В соответствии с одним аспектом изобретения мутантный аллель приводит к получению усеченного циклин-SDS-подобного белка со сниженной функцией или с потерей функции. В соответствии с другим аспектом мутантный аллель кодирует белок со вставкой, заменой или удалением одной или нескольких аминокислот в консервативном домене циклин-SDS-подобного белка, таком как домен Cyclin\_N (pfam00134) или домен Cyclin\_C (pfam02984). Специалист может идентифицировать домен Cyclin\_N и домен Cyclin\_C белка, например, путем сравнения белковых последовательностей с помощью программы BLAST на сайте NCBI (адрес в Интернете: [blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)) или с помощью поиска в базе данных консервативных доменов NCBI (адрес в Интернете: [ncbi.nlm.nih.gov/cdd](http://ncbi.nlm.nih.gov/cdd)).

В последовательности SEQ ID NO: 2 домен Cyclin\_N находится в диапазоне от аминокислоты 388

до аминокислоты 463, а домен Cyclin\_C находится в диапазоне от аминокислоты 466 до аминокислоты 531.

Путем сравнения белковых последовательностей с помощью программы BLAST можно идентифицировать домены Cyclin\_N и Cyclin\_C в соответствии с используемым поисковым запросом, включая выравнивание запрашиваемой последовательности с доменом. Необходимо отметить, что при указании определенного диапазона значений ("от... до...") подразумевается, что такой диапазон включает конечные значения, т.е. включает в себя первое и последнее указанное значение. Таким образом, для любой из белковых последовательностей, указанных в настоящем документе, или для других вариантных последовательностей (например, белков, включающих по меньшей мере 70, 80, 90, 95% или более идентичности последовательности с любой из белковых последовательностей, указанных в настоящем документе, например, SEQ ID NO: 2, 6, 12, 19 или 20) могут быть определены домены Cyclin\_N и Cyclin\_C.

В последовательности SEQ ID NO: 6 домен Cyclin\_N находится в диапазоне от аминокислоты 351 до аминокислоты 481, а домен Cyclin\_C находится в диапазоне от аминокислоты 486 до аминокислоты 577.

В последовательности SEQ ID NO: 12 домен Cyclin\_N находится в диапазоне от аминокислоты 343 до аминокислоты 473, а домен Cyclin\_C находится в диапазоне от аминокислоты 478 до аминокислоты 569.

В последовательности SEQ ID NO: 19 домен Cyclin\_N находится в диапазоне от аминокислоты 362 до аминокислоты 494, а домен Cyclin\_C находится в диапазоне от аминокислоты 499 до аминокислоты 584.

В последовательности SEQ ID NO: 20 домен Cyclin\_N находится в диапазоне от аминокислоты 332 до аминокислоты 464, а домен Cyclin\_C находится в диапазоне от аминокислоты 469 до аминокислоты 554.

Растения, в которых мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, присутствует в гетерозиготном состоянии, являются растениями с мужской фертильностью и будут давать семена. Таким образом, эти растения можно использовать для введения мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, в другие растения, или их можно использовать для придания растению, в котором присутствует мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, дополнительных характеристик. Эти растения также можно использовать для размножения растений, содержащих мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. 50% потомства, полученного в результате самоопыления, в каждом случае будут продолжать нести мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, в гетерозиготном состоянии. Таким образом, растения, в которых присутствует мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, могут использоваться, например, для селекции.

Таким образом, один вариант осуществления настоящего изобретения относится к клеткам растений или растениям по настоящему изобретению, которые являются гетерозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения сниженная активность циклин-SDS-подобного белка в растениях или клетках растений по изобретению вызвана мутантным аллелем гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, который присутствует в таких клетках растений или растениях, соответственно.

В соответствии с одним аспектом изобретения клетки растений или растения по настоящему изобретению являются гомозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, кодирующему снижению или потере функции циклин-SDS-подобного белка. Растения по настоящему изобретению, которые являются гомозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, дают бессемянные плоды после опыления собственной пыльцой или пыльцой, полученной из другого растения (например, из растения дикого типа).

Таким образом, еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к клеткам растений или растениям по настоящему изобретению, которые являются гомозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок.

Мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, обеспечивает мужскую фертильность растения, однако при этом растение дает бессемянные плоды, когда растение является гомозиготным по мутантному аллелю. В соответствии с различными вариантами осуществления изобретения мутация в мутантном аллеле гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, может представлять собой любую мутацию, включая делеции, мутации с усечением, вставки, точечные мутации, нонсенс-мутации, миссенс- или несинонимичные мутации, мутации сайта сплайсинга, мутации со сдвигом рамки и/или мутации в регуляторных последовательностях. Предпочтительно, мутация в мутантном аллеле гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, является точечной мутацией и/или мутацией сайта сплайсинга. Мутация может происходить в последовательности ДНК, содержащей кодирующую последовательность гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, или в последовательности РНК, кодирующей циклин-SDS-подобный белок, или она может происходить в аминокислоте циклин-SDS-подобного белка. Что касается последовательности ДНК гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, мутация может происходить в кодирующей последовательности (cds, состоит из экзонов) или в не-

кодирующих последовательностях, таких как 5'- и 3'-нетранслируемые области, интроны, промоторы, энхансеры и т.д., гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Что касается РНК, кодирующей циклин-SDS-подобный белок, мутация может происходить в пре-мРНК или мРНК. В соответствии с одним аспектом мутантный аллель приводит снижению, уменьшению или потере функции белка из-за замены, вставки и/или удаления одной или нескольких аминокислот, например, в результате замены, вставки или удаления одной или нескольких аминокислот в консервативном домене Cyclin\_N и/или Cyclin\_C. Например, усечение белка с целью делеции домена Cyclin\_C или его части или домена Cyclin\_N и домена Cyclin\_C приведет к потере или снижению функции белка.

Таким образом, еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к клеткам растений или растениям по настоящему изобретению, которые содержат мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, которые отличаются тем, что такой мутантный аллель содержит или обеспечивает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из следующих мутаций:

а) делеции, мутации с усечением, вставки, точечной мутации, нонсенс-мутации, миссенс- или несинонимичной мутации, мутации сайта сплайсинга, мутации со сдвигом рамки в геномной последовательности;

б) мутации в одной или нескольких регуляторных последовательностях;

с) делеции, мутации с усечением, вставка, точечной мутации, нонсенс-мутации, миссенс- или несинонимичной мутации, мутации сайта сплайсинга, мутации со сдвигом рамки в кодирующей последовательности;

д) делеции, мутации с усечением, вставки, точечной мутации, нонсенс-мутации, миссенс- или несинонимичной мутации, мутации сайта сплайсинга, мутация со сдвигом рамки в пре-мРНК или мРНК; и/или

е) делеции, мутации с усечением, вставки или замены одной или нескольких аминокислот в циклин-SDS-подобном белке.

По сравнению с SEQ ID NO: 1, один из мутантных аллелей гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, раскрытого в настоящем документе в качестве одного из вариантов осуществления (присутствующего в мутантном растении арбуза EMB1), имеет точечную мутацию (замена G на A) в нуклеотидном положении 2185 в SEQ ID NO: 1. мРНК, транскрибированная с описанного мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, представлена под SEQ ID NO: 3. Соответствующие нуклеотиды в положениях 2186-2201 аллеля дикого типа гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, представленного под SEQ ID NO: 1, не присутствуют в мРНК, представленной под SEQ ID NO: 3. Таким образом, точечная мутация, обнаруженная в мутантном аллеле гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, вызывает делецию 16 нуклеотидов в мРНК, транскрибированной с мутантного аллеля, по сравнению с мРНК, транскрибированной с соответствующего аллеля дикого типа. Делеция в мРНК, транскрибируемой с мутантного аллеля, объясняется мутацией сайта сплайсинга, что приводит к альтернативному сплайсингу соответствующей мРНК. Кроме того, делеция 16 нуклеотидов в мРНК, транскрибированной с описанного мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, вызывает сдвиг рамки считывания мРНК, транскрибированной с мутантного аллеля, по сравнению с мРНК, транскрибированной с соответствующего аллеля дикого типа. Белок, который транслируется с аллеля дикого типа гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, представлен под SEQ ID NO: 2. Белок, который транслируется с мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, представлен под SEQ ID NO: 4. Соответствующая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты 358-363 (Ile-Leu-Arg-Phe-Glu-Glu) в SEQ ID NO: 2 отсутствует в SEQ ID NO: 4 и из-за сдвига рамки считывания остальные аминокислотные последовательности отличаются, и происходит замена аминокислот 364-562 в SEQ ID NO: 2 восемью aberrантными аминокислотами Asn-Trp-Thr-Met-Lys-Lys-Pro-Ile в SEQ ID NO: 4 (т.е. аминокислотами 358-365 SEQ ID NO: 4). Мутантный циклин-SDS-подобный белок намного короче, всего 365 аминокислот, по сравнению с белком дикого типа из 562 аминокислот. Таким образом, аминокислотная последовательность мутантного циклин-SDS-подобного белка, представленного под SEQ ID NO: 4, включает делеции и замены аминокислот по сравнению с циклин-SDS-подобным белком дикого типа, представленным под SEQ ID NO: 2. Кроме того, сдвиг рамки считывания мРНК, транскрибированной с мутантного аллеля гена, кодирующего SDS-подобный белок, вызывает нонсенс-мутацию, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона (нуклеотиды 1096-1098 в SEQ ID NO: 3), в результате чего получают аминокислотную последовательность, кодированную мутантным аллелем, усеченную на 197 аминокислот на С-конце по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью, кодированной аллелем дикого типа, представленным под SEQ ID NO: 2. Таким образом, по сравнению с белком дикого типа из-за сдвига рамки 205 аминокислот С-конца дикого типа заменены на 8 различных (aberrантных) аминокислот на С-конце, в результате чего получают мутантный белок, который на 197 аминокислот короче, чем белок дикого типа. Таким образом, мутантный белок укорочен по сравнению с белком дикого типа, так как в мутантном белке отсутствуют 205 аминокислот С-конца белка дикого типа. Из белка дикого типа в мутантном белке присутствуют лишь аминокислоты экзона 1 (аминокислоты 1-357 SEQ ID NO: 2). Это означает, что также в нем отсутствуют консервативные белковые домены Cyclin\_N и Cyclin\_C; это означает, что в мутантном белке имеет место

потеря функции (т.е. мутантный аллель представляет собой аллель с потерей функции) или снижение функции.

Таким образом, в частности, в соответствии с одним аспектом в настоящем описании для примера представлена нуклеотидная последовательность мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, в которой имеется точечная мутация (нуклеотидная замена) по сравнению с нуклеотидной последовательностью соответствующего гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, дикого типа. Точечная мутация в мутантном аллеле гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, вызывает мутацию сайта сплайсинга, что приводит к альтернативному сплайсингу соответствующей мРНК. Альтернативный сплайсинг вызывает сдвиг рамки в открытой рамке считывания мРНК, транскрибированной с мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Сдвиг рамки в открытой рамке считывания мРНК, транскрибированной с мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, вызывает делецию нуклеотидов, замену нуклеотидов (миссенс-или несинонимичные мутации) и создание нонсенс-мутаций, создающих преждевременный стоп-кодон в мРНК, транскрибируемой с мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, по сравнению с мРНК, транскрибируемой с соответствующего гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, дикого типа. В соответствующей аминокислотной последовательности белка, транслированного с мРНК, транскрибированной с мутантного гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, наблюдается делеция аминокислот, замена аминокислот и усечение аминокислотной последовательности на С-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью, транслируемой с мРНК, транскрибированной с соответствующего гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, дикого типа. Поскольку точечная мутация находится в первом интроне, в мутанте отсутствуют аминокислоты, кодируемые экзонами 2, экзонами 3 и экзонами 4 циклин-SDS-подобного белка дикого типа, т.е. в мутантном белке присутствуют лишь аминокислоты, кодируемые экзонами 1 SDS-подобного белка дикого типа.

В арбузе экзон 1 циклин-SDS-подобного белка кодирует аминокислоты 1-357 в SEQ ID NO: 2; в дыне экзон 1 циклин-SDS-подобного белка кодирует аминокислоты 1-338 в SEQ ID NO: 6; в огурце экзон 1 циклин-SDS-подобного белка кодирует аминокислоты 1-330 в SEQ ID NO: 12; в томате экзон 1 циклин-SDS-подобного белка кодирует аминокислоты 1-350 в SEQ ID NO: 19; в перце экзон 1 циклин-SDS-подобного белка кодирует аминокислоты 1-320 в SEQ ID NO: 20.

В дополнение к мутантному растению арбуза EMB1, описанному выше (и в разделе "Примеры"), путем мутагенеза было получено другое растение арбуза, включающее другую мутацию в гене, кодирующем циклин-SDS-подобный белок. Это мутантное растение включает нуклеотидную замену С (цитозин) на Т (тимин) в нуклеотиде 1687 SEQ ID NO: 1, что приводит к тому, что кодон sag (кодирующий аминокислоту глутамин, аминокислота 224 белка дикого типа) меняется на кодон tag, который является стоп-кодоном. Мутантная кДНК представлена в SEQ ID NO: 17, а усеченный белок, содержащий лишь часть аминокислот, кодируемых экзонами 1 (т.е. лишь аминокислоты 1-223 вместо аминокислот 1-357), представлен в SEQ ID NO: 18. Как и в мутантном растении EMB1, в мутантном белке отсутствуют два консервативных домена, домен Cyclin\_N и Cyclin\_C. Кроме того, этот мутант приводит к потере функции циклин-SDS-подобного белка (или по меньшей мере к снижению функции).

В соответствии с одним аспектом изобретения мутантный аллель гена, кодирующего циклин SDS-подобный белок, имеет мутацию, приводящую к удалению одной или нескольких или всех аминокислот, кодирующих домен Cyclin\_N и/или Cyclin\_C, или к их замене другими аминокислотами, по сравнению с диким типом. В соответствии с одним аспектом изобретения мутантный аллель приводит к получению усеченного белка, в котором отсутствует весь домен Cyclin\_N или его часть и/или весь домен Cyclin\_C или его часть. Например, мутантный аллель содержит мутацию, в результате которой получают преждевременный стоп-кодон, в результате чего весь домен Cyclin\_N или его часть и/или весь домен Cyclin\_C или его часть отсутствуют в полученном белке.

В соответствии с одним аспектом мутантный аллель представляет собой мутантный аллель циклин-SDS-подобного гена арбуза SEQ ID NO: 1 и дает белок SEQ ID NO: 4 или белок SEQ ID NO: 18.

В соответствии с одним аспектом изобретения мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, имеет мутацию, приводящую к отсутствию экзонов 2, 3 и/или 4 белка дикого типа, которые кодируют аминокислоты. Таким образом, в соответствии с одним аспектом мутантный аллель кодирует усеченный циклин-SDS-подобный белок или белок, содержащий делецию, в котором отсутствуют аминокислоты, кодируемые экзонами 2, 3 и/или 4 белка дикого типа, т.е. в котором отсутствуют аминокислоты 358-413 SEQ ID NO: 2 (экзон 2) или аминокислоты 339-394 SEQ ID NO: 6 (экзон 2), аминокислоты 331-386 SEQ ID NO: 12 (экзон 2), аминокислоты 351-407 SEQ ID NO: 19 (экзон 2), аминокислоты 321-377 SEQ ID NO: 20 (экзон 2), и/или аминокислоты 414-469 SEQ ID NO: 2 (экзон 3) или аминокислоты 395-493 SEQ ID NO: 6 (экзон 3) или аминокислоты 387-485 SEQ ID NO: 12, аминокислоты 408-506 SEQ ID NO: 19 (экзон 3), аминокислоты 378-476 SEQ ID NO: 20 (экзон 3), и/или аминокислоты 470-562 SEQ ID NO: 2 (экзон 4) или аминокислоты 494-577 SEQ ID NO: 6 (экзон 4) или аминокислоты 486-569 SEQ ID NO: 12 (экзон 4), аминокислоты 507-590 SEQ ID NO: 19 (экзон 4), аминокислоты 477-560 SEQ ID NO: 20 (экзон 4). При необходимости, мутантный аллель кодирует усеченный циклин-SDS-подобный белок или белок, содержащий делецию, в котором также отсутствует весь экзон 1, кодирую-

щий аминокислоты, или его часть, т.е. в нем отсутствуют аминокислоты 1-357 в SEQ ID NO: 2 или аминокислоты 1-338 в SEQ ID NO: 6 или аминокислоты 1-330 в SEQ ID NO: 12 или аминокислоты 1-350 в SEQ ID NO: 19 или аминокислоты 1-320 в SEQ ID NO: 20. Для соответствующих аминокислот, путем парного выравнивания геномной ДНК или аминокислотных последовательностей могут быть идентифицированы области, кодируемые экзонами 1, 2, 3 и 4 других циклин-SDS-подобных белков, например, ортологов из других видов. Отмечается, что было определено, что лишь для SEQ ID NO: 2 экзоны являются реальными экзонами (разделенными интронами в геномной ДНК), в то время как для других последовательностей экзоны были определены выравниванием и могут не являться реальными экзонами, но являются скорее аминокислотами, соответствующими экзонам SEQ ID NO: 2 и, следовательно, могут также просто называться аминокислотными областями белка.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, имеет мутацию на 5'-конце кодирующей последовательности (кодирующей N-конец белка) или приводит к такой мутации. Более предпочтительно мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, имеет точечную мутацию и/или усечение на 5'-конце кодирующей последовательности (кодирующей N-конец белка) или приводит к такой мутации к такому усечению. Специалистам известно, что в результате мутации в стартовом кодоне (ATG) гена соответствующий ген не транслируется в соответствующий полноразмерный белок. Для трансляции может использоваться следующий возможный стартовый кодон (ATG), но это приведет к усечению аминокислотной последовательности белка на N-конце, если следующий ATG появится в той же рамке считывания, или к получению белка, имеющего другую аминокислотную последовательность. В обоих случаях соответствующая мутация на 5'-конце приведет к получению белка со сниженной ферментативной активностью или к потере ферментативной активности. В предпочтительном варианте осуществления изобретения мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, имеет мутацию в старт-кодоне. Мутацией в старт-кодоне может являться точечная мутация в любом из его трех нуклеотидов или делеция/усечение по меньшей мере первого по меньшей мере первого и второго или по меньшей мере всех трех нуклеотидов старт-кодона.

Еще один предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к мутантным аллелям гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, которые приводят к делеции на 3'-конце кодирующей последовательности (кодирующей C-конец белка). Поскольку консервативный домен Cyclin\_C присутствует на C-конце белка, усечение, которое приводит к отсутствию части домена Cyclin\_C (например, к отсутствию 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот домена Cyclin\_C или даже к отсутствию всего домена Cyclin\_C), приведет к белку со сниженной функцией или с потерей функции. Более длинное усечение на C-конце даже приведет к удалению всего домена Cyclin\_N или его части, в результате чего также будет получен белок со сниженной функцией или с потерей функции. Между доменами Cyclin\_C и Cyclin\_N всего пять аминокислот. Усечение приблизительно 90 или более аминокислот на C-конце приводит к тому, что в большинстве циклин-SDS-подобных белков отсутствует домен Cyclin\_C, а при более длинных усечениях (95, 100, 110 или более аминокислот) по меньшей мере частично будет удален домен Cyclin\_N. Как было указано ранее, такие усечения входят в объем настоящего изобретения, так как в результате таких усечений получают белок со сниженной функцией или с потерей функции. Как было указано ранее, для того, чтобы убедиться в том, что белок обладает сниженной функцией, может осуществляться проверка наличия ожидаемого фенотипа в мутантном растении, являющимся гомозиготным по мутантному аллелю.

Предпочтительно, мутантные аллели гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, приводят к усечению по меньшей мере 10, 20, 30, 40 или 50 нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 100 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 200 нуклеотидов, еще более предпочтительно по меньшей мере 300 нуклеотидов, еще более предпочтительно по меньшей мере 400 нуклеотидов и наиболее предпочтительно по меньшей мере 500 нуклеотидов, в частности, предпочтительно по меньшей мере 615 нуклеотидов на 3'-конце кодирующей последовательности белка. Усечение 591 нуклеотидов в кодирующей последовательности приводит при трансляции к усечению на 197 аминокислот для соответствующей последовательности белка. Предпочтительный пример циклин-SDS-подобного белка с усечением 197 аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующего циклин-SDS-подобного белка дикого типа (SEQ ID NO: 2) представлен под SEQ ID NO: 4. Другим примером является усечение 339 аминокислот (т.е. усечение 1017 нуклеотидов кодирующей области) по сравнению с соответствующим SDS-подобным белком дикого типа (SEQ ID NO: 2), представленное под SEQ ID NO: 18.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, имеет любую из вышеупомянутых мутаций в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок SEQ ID NO: 2 (в результате чего кодируемый белок содержит делецию или усечение по сравнению с белком дикого типа), или в любой нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, имеющий по меньшей мере 70, 80, 90, 95% или более идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2, например, белок, представленный SEQ ID NO: 6, который имеет 71% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.

В соответствии с еще одним из вариантов осуществления изобретения мутантный аллель гена, ко-

дирующего циклин-SDS-подобный белок, имеет любую из вышеупомянутых мутаций в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок SEQ ID NO: 6 (в результате чего кодируемый белок содержит делецию или усечение по сравнению с белком дикого типа), или в любой нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, имеющий по меньшей мере 70, 80, 90, 95% или более идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 6.

В соответствии с еще одним из вариантов осуществления изобретения мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, имеет любую из вышеупомянутых мутаций в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок SEQ ID NO: 12 (в результате чего кодируемый белок содержит делецию или усечение по сравнению с белком дикого типа), или в любой нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, имеющий по меньшей мере 70, 80, 90, 95% или более идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 12.

В соответствии с еще одним из вариантов осуществления изобретения мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, имеет любую из вышеупомянутых мутаций в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок SEQ ID NO: 19 (в результате чего кодируемый белок содержит делецию или усечение по сравнению с белком дикого типа), или в любой нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, имеющий по меньшей мере 70, 80, 90, 95% или более идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 19.

В соответствии с еще одним из вариантов осуществления изобретения мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, имеет любую из вышеупомянутых мутаций в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок SEQ ID NO: 20 (в результате чего кодируемый белок содержит делецию или усечение по сравнению с белком дикого типа), или в любой нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, имеющий по меньшей мере 70, 80, 90, 95% или более идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 20.

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления изобретения мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, имеет любую из вышеупомянутых мутаций в нуклеотидной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1 или в последовательности, имеющей по меньшей мере 58 или 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% или особенно предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 1. В соответствии с одним аспектом изобретения мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, содержит мутацию в нуклеотидной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1 или в вариантной последовательности, имеющей по меньшей мере 58 или 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно 90% или особенно предпочтительно 95% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 1, при этом нуклеотид гуанин (G) в нуклеотидном положении 2185 в SEQ ID NO: 1 заменяется аденином (A), цитозином (C) или тиминном (T), наиболее предпочтительно нуклеотид гуанин (G) в нуклеотидном положении 2185 в SEQ ID NO: 1 или эквивалентный нуклеотид в вариантной последовательности заменяется аденином (A). Наиболее предпочтительно мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, имеет нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1, за исключением того, что нуклеотид гуанин (G) в нуклеотидном положении 2185 в SEQ ID NO: 1 заменяется аденином (A), цитозином (C) или тиминном (T), наиболее предпочтительно, нуклеотид гуанин (G) в нуклеотидном положении 2185 в SEQ ID NO: 1 заменяется аденином (A). В соответствии с другим аспектом изобретения мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, содержит мутацию в нуклеотидной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1 или в вариантной последовательности, имеющей по меньшей мере 58% или 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно 80%, еще более предпочтительно 90% или особенно предпочтительно 95% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 1, при этом в мутантном аллеле гена, кодирующего SDS-подобный белок, нуклеотид цитозин (C) в нуклеотидном положении 1687 или эквивалентный нуклеотид в вариантной последовательности заменяется другим нуклеотидом, предпочтительно тиминном (T).

Другой вариант осуществления изобретения относится к клеткам растений, частям растений или растениям, которые содержат или синтезируют мРНК, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, при этом мРНК, кодирующая циклин-SDS-подобный белок, имеет одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из:

- a) делеционной мутации;
- b) миссенс-мутации или несинонимичной мутации;
- c) мутации со сдвигом рамки; и/или
- d) нонсенс-мутации.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения клетки растений, части растений или растения по настоящему изобретению содержат или синтезируют мРНК, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, который имеет одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из:

- a) делеционной мутации;
- b) миссенс-мутации или несинонимичной мутации;
- c) мутации со сдвигом рамки; и/или
- d) нонсенс-мутации.

В отношении делеций и замен одного или нескольких нуклеотидов клетки растений или растения по настоящему изобретению предпочтительно содержат или синтезируют мРНК, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, при этом мРНК содержит делецию по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14 или предпочтительно по меньшей мере 16 нуклеотидов по сравнению с мРНК, кодирующей циклин-SDS-подобный белок дикого типа. В соответствии с одним аспектом нуклеотиды, удаленные в мРНК, представляют собой один или несколько нуклеотидов экзона 1, экзона 2, экзона 3 и/или экзона 4 циклин-SDS-подобного белка, и/или нуклеотиды, удаленные в мРНК, представляют собой один или несколько нуклеотидов доменов Cyclin\_N или Cyclin\_C циклин-SDS-подобного белка. В одном аспекте нуклеотиды представляют собой нуклеотиды экзона 2, например, один или несколько нуклеотидов или все нуклеотиды, начиная с нуклеотида 2186 и заканчивая нуклеотидом 2201 SEQ ID NO: 1.

Предпочтительно, клетки растений или растения по настоящему изобретению содержат или синтезируют мРНК, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, при этом мРНК отличается тем, что она содержит мутацию со сдвигом рамки и/или нонсенс-мутацию. Нонсенс-мутация создает преждевременный стоп-кодон и, следовательно, усечение кодирующей последовательности мРНК. Предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к растениям или клеткам растений по изобретению, которые содержат или синтезируют мРНК, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, при этом мРНК отличается тем, что она содержит усечение кодирующей последовательности. Такое усечение кодирующей последовательности мРНК циклин-SDS-подобного белка предпочтительно представляет собой усечение по меньшей мере 100 нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 200 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 300 нуклеотидов, еще более предпочтительно по меньшей мере 400 нуклеотидов, еще более предпочтительно по меньшей мере 500 нуклеотидов, особенно предпочтительно по меньшей мере 591 нуклеотида по сравнению с мРНК, кодирующей циклин-SDS-подобный белок дикого типа. В соответствии с одним аспектом усечение кодирующей последовательности мРНК приводит к отсутствию экзона 2, 3 и 4 или к отсутствию экзона 3 и 4 или к отсутствию экзона 4. В соответствии с еще одним аспектом усечение кодирующей последовательности мРНК приводит к отсутствию всего экзона 1 или его части, отсутствию всего экзона 2, отсутствию всего экзона 3 и отсутствию всего экзона 4. В соответствии с еще одним аспектом мутация со сдвигом рамки приводит к тому, что весь экзон 2 или его часть находится в другой рамке считывания. В соответствии с другим аспектом мутация со сдвигом рамки приводит к тому, что весь экзон 3 или его часть и/или экзон 4 находится в другой рамке считывания. Сдвиг рамки может быть вызван делецией одного или нескольких нуклеотидов (в любом количестве не кратном трем, например, 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 нуклеотидов и т.д.), в результате которой происходит изменение рамки считывания.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения растения клетки или части растений по настоящему изобретению содержат или синтезируют мРНК, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, при этом мРНК имеет по меньшей мере 58% или по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% или особенно предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с соответствующей кодирующей последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 17, при условии, что мРНК, кодирующая циклин-SDS-подобный белок, содержит нонсенс-мутацию или преждевременный стоп-кодон. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения стоп-кодон находится в экзоне 1 SEQ ID NO: 1, например, в нуклеотидах 1687-1689. В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления изобретения растения, клетки или части растений по настоящему изобретению содержат или синтезируют мРНК, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, при этом мРНК имеет по меньшей мере 58 или 60% или предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% или особенно предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с кодирующей последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, при условии, что нуклеотиды 1096-1098 в SEQ ID NO: 3 представляют стоп-кодон. В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления изобретения клетки растений или растения по настоящему изобретению содержат или синтезируют мРНК, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, с последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 3.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения клетки растений или растения по настоящему изобретению содержат или синтезируют мРНК, кодирующую циклин-SDS-подобный белок с одной или несколькими мутациями, при этом мРНК транскрибируется с мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Этими вариантами осуществления изобретения охватываются клетки растений, части растений или растения по изобретению, содержащие или синтезирующие

мРНК, транскрибируемую с мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, которая отличается тем, что такая мРНК содержит делеционную мутацию и/или миссенс-или несинонимичную мутацию и/или мутацию сдвига рамки и/или нонсенс-мутацию по сравнению с соответствующей кодирующей последовательностью (ДНК) мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, с которого транскрибируется мРНК. Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящим изобретением охватывается любая мутация, которая влияет на сплайсинг пре-мРНК, т.е. которая модифицирует нормальный процесс сплайсинга пре-мРНК, в результате чего получают другую молекулу мРНК.

В отношении делеционных мутаций клетки растений или растения по настоящему изобретению в соответствии с одним аспектом содержат или синтезируют мРНК, транскрибируемую с мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, при этом мРНК содержит делецию по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14 или предпочтительно по меньшей мере 16 нуклеотидов по сравнению с соответствующей кодирующей последовательностью (ДНК) мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, с которого транскрибируется мРНК. В соответствии с одним аспектом нуклеотиды, удаленные в мРНК, представляют собой один или несколько нуклеотидов экзона 1, экзона 2, экзона 3 и/или экзона 4 циклин-SDS-подобного белка. В одном аспекте нуклеотиды представляют собой нуклеотиды экзона 2, например, один или несколько нуклеотидов или все нуклеотиды, начиная с нуклеотида 2186 и заканчивая нуклеотидом 2201 SEQ ID NO: 1.

Предпочтительно клетки растений или растения по изобретению содержат или синтезируют мРНК, транскрибируемую с мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, которая отличается тем, что такая мРНК содержит мутацию со сдвигом рамки и/или нонсенс-мутацию по сравнению с соответствующей кодирующей последовательностью (ДНК) мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, с которого транскрибируется мРНК. Нонсенс-мутация создает преждевременный стоп-кодон в мРНК, в результате чего происходит усечение кодирующей последовательности мРНК на 3'-конце и усечение циклин-SDS-подобного белка на С-конце. Таким образом, предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к растениям или клеткам растений по изобретению, которые содержат или синтезируют мРНК, транскрибируемую с мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, которая отличается тем, что такая мРНК содержит усечение кодирующей последовательности по сравнению с кодирующей последовательностью (ДНК) мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, с которого транскрибируется мРНК. Такое усечение кодирующей последовательности мРНК гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, предпочтительно представляет собой усечение по меньшей мере 100 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 200 нуклеотидов, еще более предпочтительно по меньшей мере 300 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 400 нуклеотидов и более предпочтительно по меньшей мере 500 нуклеотидов, особенно предпочтительно по меньшей мере 591 нуклеотида по сравнению с кодирующей последовательностью (ДНК) мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, с которого транскрибируется мРНК. В соответствии с одним аспектом усечение кодирующей последовательности мРНК приводит к отсутствию экзона 2, 3 и 4 или к отсутствию экзона 3 и 4 или к отсутствию экзона 4. В соответствии с еще одним аспектом усечение кодирующей последовательности мРНК приводит к отсутствию всего экзона 1 или его части, отсутствию всего экзона 2, отсутствию всего экзона 3 и отсутствию всего экзона 4. В соответствии с еще одним аспектом мутация со сдвигом рамки приводит к тому, что весь экзон 2 или его часть находится в другой рамке считывания. В соответствии с другим аспектом мутация со сдвигом рамки приводит к тому, что весь экзон 3 или его часть и/или экзон 4 находится в другой рамке считывания. Сдвиг рамки может быть вызван делецией одного или нескольких нуклеотидов (в любом количестве не кратном трем, например, 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 нуклеотидов и т.д.), в результате которой происходит изменение рамки считывания.

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления изобретения клетки растений или растения по настоящему изобретению содержат или синтезируют мРНК, имеющую по меньшей мере 58 или 60% предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% или особенно предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с соответствующей кодирующей последовательностью (ДНК), представленной в SEQ ID NO: 1, при условии, что последовательность мРНК содержит по меньшей мере нонсенс-мутацию или преждевременный стоп-кодон по сравнению с соответствующей кодирующей последовательностью (ДНК), представленной в SEQ ID NO: 1, предпочтительно такая нонсенс-мутация находится в нуклеотидных положениях 1096-1098 в SEQ ID NO: 3. В соответствии с одним аспектом преждевременный стоп-кодон находится в нуклеотидах 1687-1689 SEQ ID NO: 1. В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления изобретения клетки растений или растения по настоящему изобретению содержат мРНК с нуклеотидной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 3.

В настоящем документе термин "кодирующая последовательность мРНК" употребляется в обще-

принятом значении. Кодированная последовательность мРНК соответствует соответствующей кодирующей последовательности ДНК гена/аллеля, за исключением того, что тимин (Т) заменен урацилом (У).

Очевидно, что любые из вышеописанных мутаций или комбинаций мутаций (например, делеция нуклеотидов, приводящая к сдвигу рамки) приводят к снижению функции или потере функции в отношении активности циклин-SDS-подобного белка в растениях, клетках или частях растений по изобретению.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к клеткам растений, частям растений или растениям, содержащим или синтезирующим циклин-SDS-подобный белок, которые отличаются тем, что аминокислотная последовательность циклин-SDS-подобного белка содержит мутацию по сравнению с соответствующим циклин-SDS-подобным белком дикого типа. Такая мутация в циклин-SDS-подобном белке приводит к снижению или к потере функции в отношении активности циклин-SDS-подобного белка в растениях, частях или клетках растений по изобретению.

Особенно предпочтительными являются растения, клетки растений или части растений по настоящему изобретению, содержащие или синтезирующие циклин-SDS-подобный белок, которые отличаются тем, что аминокислотная последовательность циклин-SDS-подобного белка содержит мутацию по сравнению с соответствующим циклин-SDS-подобным белком дикого типа.

Мутация в циклин-SDS-подобном белке может представлять собой аминокислотную замену, вставку, делецию и/или усечение по сравнению с аминокислотной последовательностью циклин-SDS-подобного белка дикого типа. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения аминокислотная последовательность циклин-SDS-подобного белка, включает делецию или усечение, более предпочтительно усечение на N-конце и/или C-конце, еще более предпочтительно усечение на C-конце. Предпочтительно, на N-конце или C-конце аминокислотной последовательности отсутствуют по меньшей мере 10 по меньшей мере 25, предпочтительно по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90 или 100, более предпочтительно по меньшей мере 150, еще более предпочтительно по меньшей мере 197 или по меньшей мере 200, 250, 300 или 339 аминокислот по сравнению с соответствующим циклин-SDS-подобным белком дикого типа. В отношении C-конца, мутация в циклин-SDS-подобном белке представляет собой усечение по меньшей мере 25, предпочтительно по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, предпочтительно по меньшей мере 100, более предпочтительно по меньшей мере 150, еще более предпочтительно по меньшей мере 197 или по меньшей мере 200, 250, 300 или 339 аминокислот по сравнению с соответствующим циклин-SDS-подобным белком дикого типа. В соответствии с еще одним аспектом мутация в циклин-SDS-подобном белке приводит к отсутствию аминокислот, кодируемых экзонами 2, 3 и 4 или к отсутствию аминокислот, кодируемых экзонами 3 и 4 или к отсутствию аминокислот, кодируемых экзоном 4. В соответствии с другим аспектом мутация приводит к отсутствию всех аминокислот, кодируемых экзоном 1 или к отсутствию их части, к отсутствию всех аминокислот, кодируемых экзоном 2, к отсутствию всех аминокислот, кодируемых экзоном 3, и к отсутствию всех аминокислот, кодируемых экзоном 4. В соответствии с другим аспектом мутация приводит к тому, что все аминокислоты, кодируемые экзоном 2, или их часть заменяются другими аминокислотами (например, из-за сдвига рамки считывания). В соответствии с другим аспектом мутация приводит к тому, что аминокислоты, кодируемые всем экзоном 3 или его частью и/или экзоном 4, заменяются другими аминокислотами (например, из-за сдвига рамки считывания). В соответствии с другим аспектом мутация приводит к тому, что весь домен Cyclin\_C или его часть и/или весь домен Cyclin\_N или его часть отсутствуют. В соответствии с другим аспектом мутация приводит к тому, что в домене Cyclin\_C и/или домене Cyclin\_N происходит замена, вставка или делеция одной или нескольких аминокислот.

Также настоящим изобретением предоставляются растения, клетки или части растений по настоящему изобретению, содержащие или синтезирующие циклин-SDS-подобный белок, который имеет по меньшей мере 58% или по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% или особенно предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 4 или под SEQ ID NO: 18. В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления изобретения белок, который содержится в растениях или клетках, или частях растений, имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4 или под SEQ ID NO: 18.

Таким образом, еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к клеткам растений или растениям, выбранным из следующих видов: арбуз, дыня, огурец, томат и перец, которые содержат мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, которые отличаются тем, что такой мутантный аллель содержит или обеспечивает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из следующих мутаций:

- а) делеции, мутации с усечением, вставки, точечной мутации, нонсенс-мутации, миссенс- или несинонимичной мутации, мутации сайта сплайсинга, мутации со сдвигом рамки в геномной последовательности;
- б) мутации в одной или нескольких регуляторных последовательностях;
- с) делеции, мутации с усечением, вставки, точечной мутации, нонсенс-мутации, миссенс- или несинонимичной мутации, мутации сайта сплайсинга, мутации со сдвигом рамки в кодирующей последова-

тельности;

д) делеции, мутации с усечением, вставки, точечной мутации, нонсенс-мутации, миссенс- или несинонимичной мутации, мутации сайта сплайсинга, мутации со сдвигом рамки в пре-мРНК или мРНК; и/или

е) делеции, мутации с усечением, вставка или замена одной или нескольких аминокислот в циклин-SDS-подобном белке.

Вышеуказанный мутантный аллель приводит к снижению активности мутантного циклин-SDS-подобного белка по сравнению с циклин-SDS-подобным белком дикого типа. Снижение активности происходит из-за нокаута экспрессии циклин-SDS-подобного гена, нокадауна экспрессии этого гена, потери функции кодируемого мутантного циклин-SDS-подобного белка или снижения функции мутантного циклина-SDS-подобного белка.

В соответствии с одним аспектом, когда растением является арбуз или клеткой растения является клетка арбуза, мутантный аллель циклин-SDS-подобного белка представляет собой мутантный аллель аллеля, кодирующего белок SEQ ID NO: 2 или белок, включающий существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2, предпочтительно по меньшей мере 60, 70, 80, 90% идентичности последовательности, при попарном выравнивании двух полноразмерных последовательностей функционального SDS-подобного белка полной длины.

В соответствии с еще одним аспектом, когда растением является дыня или клеткой растения является клетка дыни, мутантный аллель циклин-SDS-подобного белка представляет собой мутантный аллель аллеля, кодирующего белок SEQ ID NO: 6 или белок, включающий существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6, предпочтительно по меньшей мере 60, 70, 80, 90% идентичности последовательности, при попарном выравнивании двух полноразмерных последовательностей функционального SDS-подобного белка полной длины.

В соответствии с еще одним аспектом, когда растением является огурец или клеткой растения является клетка огурца, мутантный аллель циклин-SDS-подобного белка представляет собой мутантный аллель аллеля, кодирующего белок SEQ ID NO: 12 или белок, включающий существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12, предпочтительно по меньшей мере 60, 70, 80, 90% идентичности последовательности, при попарном выравнивании двух полноразмерных последовательностей функционального SDS-подобного белка полной длины.

В соответствии с еще одним аспектом, когда растением является томат или клеткой растения является клетка томата, мутантный аллель циклин-SDS-подобного белка представляет собой мутантный аллель аллеля, кодирующего белок SEQ ID NO: 19 или белок, включающий существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 19, предпочтительно по меньшей мере 60, 70, 80, 90% идентичности последовательности, при попарном выравнивании двух полноразмерных последовательностей функционального SDS-подобного белка полной длины.

В соответствии с еще одним аспектом, когда растением является перец или клеткой растения является клетка перца, мутантный аллель циклин-SDS-подобного белка представляет собой мутантный аллель аллеля, кодирующего белок SEQ ID NO: 20 или белок, включающий существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20, предпочтительно по меньшей мере 60, 70, 80, 90% идентичности последовательности, при попарном выравнивании двух полноразмерных последовательностей функционального SDS-подобного белка полной длины.

В соответствии с одним аспектом растение арбуза, дыни, огурца, томата или перца содержит мутантный циклин SDS-подобный аллель в гетерозиготной форме. В соответствии с еще одним аспектом растение арбуза, дыни, огурца, томата или перца содержит мутантный циклин SDS-подобный аллель в гомозиготной форме, в результате чего такое растение дает бессемянные плоды после опыления собственной пыльцой или пыльцой других растений. В соответствии с предпочтительным аспектом происходит нокаут мутантного циклин-SDS-подобного аллеля (т.е. ген не экспрессируется), или аллель кодирует нефункциональный циклин-SDS-подобный белок.

В объем настоящего изобретения включены семена, из которых можно выращивать такие растения, а также бессемянные плоды, полученные из указанных растений, когда аллель находится в гомозиготной форме, или плоды с семенами, полученные из указанных растений, когда аллель находится в гетерозиготной форме. Также настоящим изобретением предоставляются любые части растения, такие как черенки, материал для вегетативного размножения, клетки и т.д., содержащие в своем геноме по меньшей мере один мутантный циклин-SDS-подобный аллель.

Также настоящим изобретением предоставляются способные и неспособные к размножению клетки, содержащие по меньшей мере одну копию мутантного циклин-SDS-подобного аллеля. Очевидно, что такие способные и неспособные к размножению клетки могут быть частью органа растения или всего растения, или они могут быть выделены, например, в клеточной или тканевой культуре.

Семена, растения и части растений, которые предоставляются настоящим изобретением, и которые содержат в своем геноме по меньшей мере один мутантный циклин-SDS-подобный аллель, предпочтительно представляют собой агрономически полезные растения, например инбредные линии, линии размножения, разновидности или сорта, или гибриды F1. Предпочтительно они имеют предпочтительные

агрономические характеристики, в частности, они дают товарные плоды с хорошим качеством и однородностью.

При использовании по тексту настоящего документа термин "сорт" относится к группе растений в одном ботаническом таксоне низшего известного уровня, при этом такая группа может определяться экспрессией характеристик, полученных из определенного генотипа или комбинации генотипов.

Растение "гибрид F1" или (семя "гибрид F1") - это поколение, полученное путем скрещивания двух инбредных родительских линий. Таким образом, гибридные семена F1 представляют собой семена, из которых выращивают гибридные растения F1. Гибриды F1 обладают большей мощностью, они дают больший урожай из-за гетерозиса. Инбредные линии преимущественно гомозиготны в большинстве локусов в геноме.

Термин "растительная линия" или "линия скрещивания" относится к растению и его потомству. При использовании по тексту настоящего документа термин "инбредная линия" относится к растительной линии, которая была получена путем повторного самоопыления и является практически гомозиготной. Таким образом, термины "инбредная линия" или "родительская линия" относятся к растению, несколько поколений которого подверглось инбридингу (например по меньшей мере 5, 6, 7 или более поколений), в результате чего получают линию растений с высокой однородностью.

Циклин-SDS-подобный аллель арбуза расположен на хромосоме 7 (между нуклеотидом 7450185 и 7445051) генома. Местоположение хромосомы может быть определено путем проведения анализа всего генома с помощью программы BLAST, например, по следующему адресу в Интернете: [icugi.org/pub/genome/watermelon/97103](http://icugi.org/pub/genome/watermelon/97103)). Представляется, что циклин-SDS-подобный аллель огурца также расположен на хромосоме 5 (между нуклеотидом 848447 и 852718) генома (адрес в Интернете: [icugi.org/pub/genome/cucumber/Chinese\\_long/](http://icugi.org/pub/genome/cucumber/Chinese_long/)).

У растений арбуза мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, можно получить из семян арбуза, являющихся гетерозиготными или гомозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, который внесен в базу данных под номером NCIMB 42532. Аллель дикого типа гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, можно получить из семян арбуза, являющихся гетерозиготными или гомозиготными по аллелю дикого типа гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, который внесен в базу данных под номером NCIMB 42532. Для внесенных в базу данных семян соответствующий аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, был обозначен как emb1. Другие мутантные аллели гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, могут быть получены de novo, например, мутагенезом или другими способами, известными специалисту. Это относится к любым видам растений.

Один пример получения другого мутантного SDS-подобного аллеля de novo в арбузе, приведен в разделе "Примеры". В соответствии с этим примером авторами изобретения путем мутагенизации семян арбуза была создана мутантная популяция, а затем использован TILLING-анализ для идентификации растения, содержащего мутантный SDS-подобный аллель. Идентифицированный аллель содержит одну нуклеотидную замену в нуклеотиде 1687 SEQ ID NO: 1, в результате чего получают стоп-кодон. Таким образом, мутантный аллель кодирует усеченный циклин-SDS-подобный белок, содержащий лишь аминокислоты 1-223 белка дикого типа (см. SEQ ID NO: 18).

Клетки растений, части растений или растения, или потомство растений, полученные/получаемые из семян, являющихся гетерозиготными или гомозиготными по аллелю гена, кодирующего SDS-подобный белок, внесенных в базу данных под номером NCIMB 42532, также являются вариантом осуществления изобретения. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления клетки растений, части растений или растения, или потомство растений, полученные из семян, внесенных в базу данных под номером NCIMB 42532, являются гомозиготными по мутантному аллелю циклин-SDS-подобного кодирующего гена. Еще один вариант осуществления изобретения относится к клеткам растений, частям растений или растениям, гомозиготным по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, которые получают/могут быть получены в результате скрещивания растения арбуза, полученного из семян с номером доступа NCIMB 42532, с другим растением. Предпочтительно затем происходит самоопыление растений или клеток растений, получаемых/полученных в результате скрещивания растения, полученного из семян с номером доступа NCIMB 42532, с другим растением и, при необходимости, на следующем этапе отбираются растения, которые производят бессемянные плоды, и/или отбираются растения, гомозиготные по мутантному аллелю циклин-SDS-подобного кодирующего гена.

Термин "аллель(и)" обозначает любую одну или любые несколько альтернативных форм гена в определенном локусе, все из которых относятся к одному свойству или характеристике в определенном локусе. В диплоидной клетке организма, аллели определенного гена находятся в определенном месте или в локусе в хромосоме. Один аллель присутствует в каждой хромосоме пары гомологичных хромосом. Диплоидные виды растений могут включать в себя большое число различных аллелей в определенном локусе. Они могут быть идентичными аллелями гена (гомозиготными) или двумя разными аллелями (гетерозиготными).

"Аллель дикого типа" относится в настоящем документе к версии гена, кодирующего функциональный белок (дикий тип белка). Последовательность гена, кодирующего полностью функциональный

циклин-SDS-подобный белок, представляет собой, например, кодирующую последовательность последовательностей циклин-SDS-подобного белка дикого типа, которые представлены под SEQ ID NO: 1 (из культурного арбуза) и SEQ ID NO: 5 (из культурной дыни). Аминокислотная последовательность, кодируемая этим геном, кодирующим циклин-SDS-подобный белок дикого типа, представлена в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6, соответственно. Другие циклин-SDS-подобные белки дикого типа представлены под SEQ ID NO: 12 (огурец), SEQ ID NO: 19 (томат) и SEQ ID NO: 20 (перец). Другие нуклеотидные последовательности, кодирующие циклин-SDS-подобные белки, которые кодируют аллели полностью функционального циклин-SDS-подобного белка (т.е. варианты аллели или аллельные варианты), существуют в других растениях и могут содержать существенную идентичность последовательностей по меньшей мере с кодирующей последовательностью нуклеотидных последовательностей, представленных под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5 или с аминокислотными последовательностями, представленными под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12, или SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20. Например, циклин-SDS-подобный белок культивируемого огурца, SEQ ID NO: 12 имеет идентичность аминокислотной последовательности 86% с циклин-SDS-подобным белком дикого типа дыни (SEQ ID NO: 6) и идентичность аминокислотной последовательности 70% с SDS-подобным белком дикого типа арбуза (SEQ ID NO: 2).

В контексте настоящего изобретения термин "мутантный аллель" означает аллель, включающий мутацию по сравнению с соответствующим аллелем дикого типа. Пример мРНК, транскрибированной с мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, представлен под SEQ ID NO: 3. Соответствующая аминокислотная последовательность, кодируемая мРНК, представленной под SEQ ID NO: 3, представлена под SEQ ID NO: 4.

Термин "локус" означает определенное место или места, или участок на хромосоме, где находится, например, ген или генетический маркер.

"Мутация" в молекуле нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) представляет собой изменение одного или нескольких нуклеотидов по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа, например, путем замены, удаления или вставки одного или нескольких нуклеотидов. Примерами таких мутаций являются точечная мутация, нонсенс-мутация, миссенс-мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация со сдвигом рамки или мутация в регуляторной последовательности.

Термин "молекула нуклеиновой кислоты" употребляют в обычном значении, известном в данной области. Молекула нуклеиновой кислоты состоит из нуклеотидов, содержащих один из сахаров: ДНК-дезоксирибозу или РНК-рибозу.

"Точечная мутация" представляет собой замену одного нуклеотида, или вставку или удаление одного нуклеотида.

"Нонсенс-мутация" - это (точечная) мутация в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, в результате чего кодон в молекуле нуклеиновой кислоты превращается в терминирующий кодон. Это приводит к тому, что в мРНК присутствует преждевременный стоп-кодон, а также к трансляции усеченного белка. Усеченный белок может иметь сниженную функцию или потерю функции.

"Миссенс-мутация" или "несинонимичная мутация" - это (точечная) мутация в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, в результате которой кодон кодирует другую аминокислоту. Полученный белок может иметь сниженную функцию или потерю функции.

"Мутация сайта сплайсинга" - это мутация в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, в результате чего происходит изменение РНК сплайсинга пре-мРНК, в результате чего получают мРНК с другой нуклеотидной последовательностью и белок с другой аминокислотной последовательностью по сравнению с мРНК и белком дикого типа. Полученный белок может иметь сниженную функцию или потерю функции.

"Мутация со сдвигом рамки" - это мутация в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, в результате которой происходит изменение рамки считывания мРНК, что приводит к получению другой аминокислотной последовательности. Полученный белок может иметь сниженную функцию или потерю функции.

В контексте изобретения термин "делеция" означает, что по сравнению с соответствующей нуклеотидной последовательностью дикого типа в определенном месте в данной нуклеотидной последовательности отсутствует по меньшей мере один нуклеотид, или в данной аминокислотной последовательности отсутствует по меньшей мере одна аминокислота по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью дикого типа.

Термин "усечение" означает, что по сравнению с соответствующей нуклеотидной последовательностью дикого типа на 3'-конце или 5'-конце нуклеотидной последовательности отсутствует по меньшей мере один нуклеотид, или что по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующего белка дикого типа на N-конце или на С-конце белка отсутствует по меньшей мере одна аминокислота, при этом при усечении на 3'-конце или С-конце по меньшей мере первый нуклеотид все еще присутствует на 5'-конце или, соответственно, первая аминокислота все еще присутствует на N-конце, а при усечении на 5'-конце или N-конце, по меньшей мере, последний нуклеотид все еще присутствует на 3'-конце или, соответственно, последняя аминокислота все еще присутствует на С-конце. 5'-конец определяется

кодоном ATG, который используется в качестве старт-кодона при трансляции соответствующей нуклеотидной последовательности дикого типа.

Термин "замена" означает, что по меньшей мере один нуклеотид в нуклеотидной последовательности или одна аминокислота в белковой последовательности отличаются по сравнению с соответствующей нуклеотидной последовательностью дикого типа или, соответственно, соответствующей аминокислотной последовательностью дикого типа из-за замены нуклеотида в кодирующей последовательности соответствующего белка.

Термин "вставка" означает, что нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере один дополнительный нуклеотид или аминокислоту по сравнению с соответствующей нуклеотидной последовательностью дикого типа или, соответственно, соответствующей аминокислотной последовательностью дикого типа.

В контексте настоящего изобретения термин "преждевременный стоп-кодон" означает, что стоп-кодон присутствует в кодирующей последовательности (cds), которая ближе к старт-кодону на 5'-конце по сравнению со стоп-кодоном соответствующей кодирующей последовательностью дикого типа.

"Мутация в регуляторной последовательности", например в промоторе или энхансере гена - это изменение одного или нескольких нуклеотидов по сравнению с последовательностью дикого типа, например, путем замены, удаления или вставки одного или нескольких нуклеотидов, что приводит, например, к снижению или к отсутствию мРНК-транскрипта гена.

В настоящем документе термин "гомозиготный" означает, что все копии данного гена или аллеля в соответствующем хромосомном локусе в клетке или организме являются идентичными. В настоящем документе термин "гомозиготный по мутантному аллелю" означает, что все копии соответствующего мутантного аллеля в соответствующем хромосомном локусе в клетке или организме являются идентичными.

В настоящем документе термин "гетерозиготный" означает, что по меньшей мере одна копия данного гена или аллеля в определенном хромосомном локусе в клетке или организме отличается от других копий генов или аллелей в соответствующих локусах в других хромосомах. В настоящем документе термин "гетерозиготный по мутантному аллелю" означает, что последовательность по меньшей мере одного аллеля в определенном хромосомном локусе в клетке или организме отличается от других аллелей в соответствующих локусах в других хромосомах.

"Мутация в белке" - это изменение одного или нескольких аминокислотных остатков по сравнению с последовательностью дикого типа, например путем замены, делеции, усечения или вставки одного или нескольких аминокислотных остатков.

Специалистам известны биотехнологические способы введения мутаций в целевой ген/аллель растения или клетки растения. Таким образом, с использованием этих способов в растениях или в клетках растений могут быть получены мутантные аллели гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. В частности, примерами таких технологий являются техники мутагенеза или ферменты, которые индуцируют разрывы двухцепочечной ДНК (фермент, индуцирующий разрыв двухцепочечной ДНК (DSBI)) в геноме растений. Известными и применяемыми технологиями являются эндонуклеазы с редким расщеплением или индивидуально подобранные эндонуклеазы с редким расщеплением, включая, помимо прочего, хоуминг-эндонуклеазы, также называемые мегануклеазами, эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции, ассоциированные с каталитическим доменом нуклеазы (TALEN) и так называемые системы CRISPR/Cas.

Все эти технологии могут использоваться для введения мутации в гены в растениях или клетках растений. Таким образом, вариантом осуществления изобретения также являются растения и клетки растений по изобретению с мутантным аллелем гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, при этом мутация в мутантный аллель была введена с помощью эндонуклеаз с редким расщеплением или индивидуально подобранных эндонуклеаз с редким расщеплением. Что касается индивидуально подобранных эндонуклеаз с редким расщеплением, то мутация в мутантном аллеле циклин-SDS-подобного белка предпочтительно вводится с помощью мегануклеазы, TALEN (эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции) или системы CRISPR/Cas.

При использовании по тексту настоящего документа термин "фермент, индуцирующий разрыв двухцепочечной ДНК (DSBI)" означает фермент, способный индуцировать разрыв двухцепочечной ДНК в определенной нуклеотидной последовательности, называемой "сайтом узнавания". Эндонуклеазы с редким расщеплением - это ферменты DSBI с сайтом узнавания длиной приблизительно 14-70 последовательных нуклеотидов, следовательно, они имеют очень низкую частоту расщепления даже в крупных геномах, таких как большинство геномов растений.

"Хоуминг-эндонуклеазы, также называемые мегануклеазами" составляют семейство таких эндонуклеаз с редким расщеплением. Они могут кодироваться нитронами, независимыми генами или вставочными последовательностями и демонстрируют поразительные структурные и функциональные свойства, которые отличают их от более классических рестрикционных ферментов, обычно от бактериальных систем рестрикции-модификации типа II. Их сайты распознавания имеют общую асимметрию, которая противоположна характерной диадной симметрии большинства сайтов распознавания рестриктаз. Было по-

казано, что несколько хоуминг-эндонуклеаз, кодируемых нитронами или интeинами, способствуют хоумингу их соответствующих генетических элементов в аллельные сайты без интронов или без интeинов. Путем сайт-специфического двухцепочечного разрыва в аллелях без интронов или без интeинов эти нуклеазы создают рекомбиногенные концы, которые участвуют в процессе конверсии генов, который дублирует кодирующую последовательность и приводит к вставке интрона или вставочной последовательности на уровне ДНК.

Перечень других мегануклеаз с редким расщеплением и их соответствующих сайтов узнавания представлен в табл. I в WO 03/004659 (стр. 17-20) (включен в настоящий документ посредством ссылки). Они включают I-Sce I, I-Chu I, I-Dmo I, I-Cre I, I-Csm I, PI-Fli I, Pt-Mtu I, I-Ceu I, I-Sce II, I-Sce III, HO, PI-Civ I, PI-Ctr I, PI-Aae I, PI-BSU I, PI-DhaI, PI-Dra I, PI-Mav I, PI-Mch I, PI-Mfu I, PI-Mfl I, PI-Mga I, PI-Mgo I, PI-Min I, PI-Mka I, PI-Mle I, PI-Mma I, PI-Msh I, PI-Msm I, PI-Mth I, PI-Mtu I, PI-Mxe I, PI-Npu I, PI-Pfu I, PI-Rma I, PI-Spb I, PI-Ssp I, PI-Fac I, PI-Mja I, PI-Pho I, PI-Tag I, PI-Thy I, PI-Tko I или PI-Tsp I.

Кроме того, имеются способы конструирования "индивидуально подобранные эндонуклеазы с редким расщеплением", которые распознают практически любую определенную целевую нуклеотидную последовательность. Вкратце, химерные рестрикционные ферменты могут быть получены с использованием гибридов между цинк-пальцевым доменом, сконструированным, чтобы распознавать специфическую нуклеотидную последовательность, и доменом неспецифического расщепления ДНК из природного рестрикционного фермента, такого как FokI. Такие способы описаны, например, в документах WO 03/080809, WO 94/18313 или WO 95/09233 и в Isalan et al., 2001, Nature Biotechnology 19, 656-660; Liu et al. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5525-5530). Индивидуально подобранные мегануклеазы могут быть получены путем отбора из библиотеки вариантов в соответствии с описанием в документе WO 2004/067736. Индивидуально подобранные мегануклеазы с измененной специфичностью последовательности и сродством к связыванию с ДНК могут быть получены путем рационального дизайна в соответствии с описанием в документе WO 2007/047859.

Другие примеры индивидуально подобранных эндонуклеаз включают так называемые "нуклеазы TALE" (TALEN), которые основаны на эффекторах, подобных активаторам транскрипции (TALE), из рода бактерий *Xanthomonas*, которые гибридизированы с каталитическим доменом нуклеазы (например, FOKI).

Специфичность ДНК-связывания этих TALE определяется парами высоковариабельных аминокислотных остатков (RVD) из последовательно расположенных единиц повтора аминокислот 34/35, так что один RVD специфически распознает один нуклеотид в ДНК-мишени. Единицы повтора могут быть собраны для распознавания практически любых целевых последовательностей и гибридизированы с каталитическим доменом нуклеазы для получения эндонуклеаз, специфических к последовательности (смотри, например, Boch et al., 2009, Science 326:p1509-1512; Moscou and Bogdanove, 2009, Science 326:p1501; Christian et al., 2010, Genetics 186:p757-761; и WO 10/079430, WO 11/072246, WO 2011/154393, WO 11/146121, WO 2012/001527, WO 2012/093833, WO 2012/104729, WO 2012/138927, WO 2012/138939). В документе WO 2012/138927 также описаны мономерные (компактные) TALEN и TALEN с различными каталитическими доменами, а также их комбинации.

В недавнее время был описан новый тип настраиваемой эндонуклеазной системы - так называемая "система CRISPR/Cas", в которой используется особая молекула РНК (crРНК), придающая специфичность к последовательности для расщепления ассоциированной нуклеазы Cas9 (Jinek et al, 2012, Science 337:p816-821). Такие специально разработанные эндонуклеазы с редким расщеплением также называются неприродными эндонуклеазами с редким расщеплением.

Еще один известный специалистам способ введения мутаций в ген/аллель растения или клетки растения - это так называемый мутагенез *in vivo*. Ниже в настоящем документе приведено дополнительное обсуждение соответствующей технологии.

Вариантом осуществления изобретения также являются растения и клетки растений по изобретению с мутантным аллелем гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, при этом мутация в мутантный аллель была введена с помощью мутагенеза *in vivo*.

Для создания инсерционных мутаций в растениях или клетках растений могут использоваться различные технологии, известные специалистам.

Другими вариантами осуществления изобретения являются растения и клетки растений по изобретению с мутантным аллелем гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, при этом мутация в мутантный аллель была введена с помощью инсерционного мутагенеза.

Растения и клетки растений по изобретению с мутантным аллелем гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, могут быть получены с помощью так называемого инсерционного мутагенеза. В частности, для снижения экспрессии и/или активности соответствующих генов/аллелей может использоваться вставка транспозонов и транспорт последовательностей ДНК (Т-ДНК) в такие гены/аллели, кодирующие циклин-SDS-подобные белки (Thornycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601).

Ниже в настоящем документе будет приведено дополнительное обсуждение соответствующих технологий, известных специалисту.

Термин "инсерционный мутагенез" означает, в частности, вставку транспозонов или так называемой транспортной ДНК (Т-ДНК) в ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок, в результате чего, снижается активность циклин-SDS-подобного белка в соответствующей клетке или образуется нефункциональный циклин-SDS-подобный белок.

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления изобретения растения по настоящему изобретению являются растениями с мужской фертильностью.

Растения по настоящему изобретению являются растениями с мужской фертильностью и дают бессемянные плоды, когда мутантный циклин SDS-подобный аллель присутствует в гомозиготной форме. Преимущество растений с мужской фертильностью перед растениями с мужской стерильностью заключается в том, что они смогут давать жизнеспособную пыльцу, и, следовательно, на одном поле не нужно сажать второе растение, так называемое растение-опылитель, для завязывания и развития плодов на женских растениях, которые дают бессемянные плоды. Таким образом, на всей обрабатываемой площади могут выращиваться растения, дающие бессемянные плоды, что приводит к повышению выхода бессемянных плодов с обрабатываемой площади. Кроме того, обеспечивается синхронизация времени цветения и оплодотворения для мужских и женских частей растения, так как семязачатки и пыльца производятся одним и тем же растением. Это обеспечивает достаточное опыление для получения максимального количества плодов.

В контексте настоящего изобретения термин "растение с мужской фертильностью" означает растение, производящее жизнеспособную пыльцу. То, что растение дает жизнеспособную или фертильную пыльцу, может быть продемонстрировано, например, путем использования пыльцы с соответствующего растения для перекрестного опыления другого растения и получения жизнеспособных семян в результате этого скрещивания.

В соответствии с одним аспектом фенотип растений по настоящему изобретению, дающих бессемянные плоды, может быть получен не только на диплоидных растениях, но также на полиплоидных растениях. В соответствии с одним аспектом растения по изобретению также дают бессемянные плоды, когда они имеют разную плоидность. Таким образом, очевидно, что клетки растений или растения по настоящему изобретению включают растения, имеющие любую плоидность, в том числе растения с четной плоидностью ( $2n$ ,  $4n$ ,  $6n$ ,  $8n$  и т.д.) и растения с нечетной плоидностью ( $3n$ ,  $5n$  и т.д.). В соответствии с одним аспектом мутантный ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок, является гомозиготным в диплоидных растениях, однако в соответствии с другим аспектом мутантный SDS-подобный белок является гомозиготным в полиплоидных растениях, таких как тетраплоидные арбузы. Выражение "гомозиготный в полиплоидных растениях" означает, что локус в каждой хромосоме содержит мутантный аллель, а не аллель дикого типа гена.

Полиплоидия широко распространена у растений. Она отвечает за увеличение генетического разнообразия и производство видов с повышенной устойчивостью, увеличенными размерами, мощностью и стойкостью к болезням. Очевидными преимуществами полиплоидных растений являются гетерозис и избыточность генов.

Для ряда современных плантационных культур и культур, выращиваемых на больших площадях, производилась одна или несколько дубликаций генома. Примерами являются хлопок (коэффициент умножения  $\times 6$ ), картофель ( $\times 2$ ,  $\times 3$ ), пшеница обыкновенная ( $\times 3$ ), семена масличных культур ( $\times 3$ ), кукуруза ( $\times 2$ ), соя ( $\times 2$ ), подсолнечник ( $\times 2$ ), банан ( $\times 2$ ), яблоко ( $\times 2$ ) и кофе ( $\times 2$ ) (Renny-Byfield 7 Wendel, 2014, *American J. Botany*, 101 (10), 1711-1725).

В частности, в селекции овощей, полиплоидия у различных растений была вызвана использованием химических веществ, включая колхицин, колхамин, оризалин, колцемид, трифлуралин или ампирфосметил. Примерами дубликаций генома в овощах, полученных использованием химических веществ, являются диплоидная брюссельская капуста из гаплоидных растений ( $2x$ ), тетраплоидный горох ( $2x$ ), тетраплоидные арбузы ( $2x$ ), тетраплоидные мускатные дыни ( $2x$ ), тетраплоидный лук ( $2x$ ), октаплоидные колоказии съедобные ( $4x$ ), тетраплоидные трихозанты змеевидные ( $2x$ ), триплоидные и тетраплоидные индийские огурцы ( $1,5x$ ,  $2x$ ), тетраплоидные огурцы ( $2x$ ) и тетраплоидная фасоль обыкновенная ( $2x$ ) (Kazi, 2015, *J. Global Biosciences* 4(3), 1774-1779).

Растения, содержащие мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, могут быть получены различными обычными способами, известными специалисту. Эти способы включают использование семян, внесенных в базу данных под номером NCIMB 42532. Особое преимущество этих внесенных в базу данных семян состоит в том, что растения, выращенные из семян, которые содержат мутантный аллель, будут растениями с мужской фертильностью. Таким образом, мутантный аллель гена циклин-SDS-подобного белка, присутствующего в этих растениях, можно ввести в другие растения с помощью пыльцы растений, содержащей мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, для оплодотворения других растений, в частности других растений арбуза, в частности культурного арбуза. Поскольку мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, является рецессивным, то образование бессемянных плодов наблюдается лишь в том случае, если в соответствующем растении отсутствует доминантный аллель дикого типа гена, кодирующего циклин-SDS-

подобный белок. Таким образом, в случае если в растениях присутствует аллель дикого типа гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, эти растения дают плоды с семенами. При переносе мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, из диплоидного семени, гомозиготного по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок (например, из растений под номером доступа NCIMB 42532 или из потомства таких растений), в другое растение, которое не содержит рецессивный мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, поколение F1 будет гетерозиготным и не будет проявлять фенотип бессемянных плодов. F1 требует предварительного самоопыления для получения растений, содержащих фенотип бессемянных плодов, из-за присутствия двух копий (гомозиготных) рецессивного мутантного аллеля.

Для получения тетраплоидного растения, содержащего четыре копии мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, можно использовать диплоидное растение, содержащее две копии мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Такой тетраплоид будет иметь тот же фенотип, что и диплоид, т.е. давать бессемянные плоды (которые являются тетраплоидными) и жизнеспособную пыльцу.

При переносе мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, из тетраплоидного семени в другое растение, которое не содержит рецессивный мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, поколение F1 будет гетерозиготным и не будет проявлять фенотип бессемянных плодов. Опять же, фенотип бессемянных плодов будет наблюдаться лишь в поколении, полученном из самоопыляющегося поколения F1.

Как было указано ранее, тетраплоидные растения, включающие фенотип бессемянных плодов, могут быть получены путем дупликации хромосом диплоидного растения гомозиготного по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок (например, из семени, гомозиготного по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, из растений под номером доступа NCIMB 42532 или из растений, гомозиготных по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, полученных путем скрещивания растения, полученного из семян под номером доступа NCIMB 42532, с другим растением и, при необходимости, путем последующего самоопыления растений, полученных в результате такого скрещивания). Полученные таким образом тетраплоидные растения содержат четыре копии мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок.

Специалистам очевидно, что клетки растений, размножающиеся половым путем (пыльца и семязачаток), содержат набор хромосом, который составляет половину набора оставшихся клеток указанного растения. Из пыльцы растений и семязачатков можно получить целые растения. Таким образом, если растения имеют четную плоидность, как правило, можно уменьшить плоидность наполовину после регенерации пыльцы или семязачатков. Из растений по настоящему изобретению с четной плоидностью (например, 2n, 4n, 6n, 8n и т.д.), могут быть получены растения с половинным набором хромосом (например, 1n, 2n, 3n, 4n и т.д., соответственно) путем регенерации пыльцы или семязачатка.

Диплоидные растения по изобретению могут, например, быть получены из клеток пыльцы или клеток семязачатка, содержащих мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, при этом клетки пыльцы или семязачатка получены из тетраплоидного растения, содержащего мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Предпочтительно, пыльца или семязачаток клеток, полученных из тетраплоидного растения, содержат мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, в гомозиготном состоянии. Затем полученные диплоидные растения могут использоваться для дальнейшего размножения и получения растений с фенотипом бессемянных плодов.

Триплоидные растения могут быть получены путем скрещивания диплоидного (2n) растения по изобретению с тетраплоидным (4n) растением по изобретению. Семена гибридных растений, полученных в результате такого скрещивания, будут триплоидными (3n). Предпочтительно диплоидные (2n) и тетраплоидные (4n) растения по изобретению, скрещенные друг с другом, являются гомозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Полученные триплоидные семена (и триплоидные растения, выращенные из семян) будут иметь три копии мутантного аллеля. Диплоидное растение, используемое для получения триплоидного гибрида, может представлять собой, например, растение, которое получено/может быть получено из семян, являющихся гомозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, полученный из семян с номером доступа NCIMB 42532.

Растения (например, диплоидные, триплоидные или тетраплоидные или растения с другой плоидностью) и части растения (такие как плоды), содержащие мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, полученные/получаемые одним из вышеописанных способов, также являются вариантом осуществления изобретения. Также вариантом осуществления изобретения являются семена, из которых могут быть выращены такие растения.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения клетки растений или растения по изобретению имеют четную плоидность, предпочтительно, такие растения являются диплоидными (2n) или тетраплоидными (4n).

Растения с нечетной плоидностью, например триплоидные (3n) растения, как правило, являются растениями с мужской и женской стерильностью, так как при мейозе хромосомы не разделяются поровну

между двумя дочерними клетками. Преимуществом растений с четной плоидностью, например диплоидных ( $2n$ ) или тетраплоидных ( $4n$ ) растений, перед растениями с нечетной плоидностью, например, триплоидными ( $3n$ ) растениями является то, что растения с четной плоидностью могут производить жизнеспособную пыльцу и/или жизнеспособные семязачатки. Как следствие, растения с четной плоидностью могут выращиваться без второго растения, так называемого растения-опылителя, необходимого для завязывания плодов и развития растения с нечетной плоидностью. Растения-опылители также будут давать плоды, как правило, такие плоды будут с семенами. Перед сбором урожая или после такие плоды с семенами надо отделять от бессемянных плодов. Таким образом, преимущество растений с четной плоидностью перед растениями с нечетной плоидностью состоит в том, что нет необходимости отделять нежелательные плоды с семенами, полученные от растений-опылителей, от целевых бессемянных плодов.

В контексте настоящего изобретения выражение "четная плоидность" означает, что при делении количества гомологичных наборов хромосом, присутствующих в клетке или организме, на два получают целое число. Клетки или организмы, следовательно, являются диплоидными ( $2n$ ), тетраплоидными ( $4n$ ), гексаплоидными ( $6n$ ), октаплоидными ( $8n$ ) и т.д.

В контексте настоящего изобретения выражение "нечетная плоидность" означает, что при делении количества гомологичных наборов хромосом, присутствующих в клетке или организме, на два не получают целое число. Клетки или организмы, следовательно, являются гаплоидными ( $1n$ ), триплоидными ( $3n$ ) и т.д.

В контексте настоящего изобретения выражение "диплоидное растение или клетка растения" означает растение, вегетативную часть растения, плод или семя, или клетку растения, которые имеют два набора соответствующих хромосом; такие растения или клетки обозначены в настоящем документе  $2n$ .

В контексте настоящего изобретения выражение "тетраплоидное растение или клетка" означает растение, вегетативную часть растения, плод или семя, или клетку растения, которые имеют четыре набора соответствующих хромосом; такие растения или клетки обозначены в настоящем документе  $4n$ .

Клетками растений по изобретению могут быть клетки растений, из которых можно получить целое растение, или клетки, из которых нельзя получить целые растения. Таким образом, клетками растений по изобретению могут быть клетки растений, которые непригодны для получения целого растения.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения растения по настоящему изобретению являются растениями с мужской фертильностью и имеют четную плоидность. Предпочтительно, растения по настоящему изобретению являются диплоидными ( $2n$ ) или тетраплоидными ( $4n$ ) растениями с мужской фертильностью.

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления изобретения растения по настоящему изобретению являются стеноспермокарпическими растениями. Более предпочтительно, растения по настоящему изобретению являются стеноспермокарпическими растениями с мужской фертильностью. В соответствии с еще более предпочтительным вариантом осуществления изобретения растения по настоящему изобретению являются стеноспермокарпическими растениями с мужской фертильностью и имеют четную плоидность. Особенно предпочтительно, растения по настоящему изобретению являются диплоидными ( $2n$ ) или тетраплоидными ( $4n$ ) стеноспермокарпическими растениями с мужской фертильностью.

Стеноспермокарпические растения дают бессемянные плоды. Преимущество стеноспермокарпических растений с мужской фертильностью перед известными стеноспермокарпическими растениями состоит в том, что для них не требуется другое растение-опылитель, которое выращивают на том же поле, однако, тем не менее, они дают бессемянные плоды. Растения-опылители дают нежелательные плоды с семенами, которые необходимо отделять от бессемянных плодов. Таким образом, преимуществом стеноспермокарпических растений с мужской фертильностью является то, что отсутствует конкуренция за площадь питания и питательные вещества между растением, дающим целевые бессемянные плоды, и растениями-опылителями, в результате чего выход целевых бессемянных плодов с доступной обрабатываемой площади увеличивается.

Термин "стеноспермокарпия" является общеизвестным для специалистов в данной области, в контексте настоящего изобретения он означает, что для завязывания плодов и начала их развития требуется опыление, при этом растения не дают плоды со зрелыми или жизнеспособными семенами. Развитие зрелых или жизнеспособных семян у стеноспермокарпических растений не происходит из-за остановки семян в развитии или деградации деградации семязачатка и/или зародышей и/или эндосперма или аборта семязачатка и/или зародышей и/или эндосперма до достижения зрелости.

От стеноспермокарпии необходимо отличать партенокарпию. Термин "партенокарпия" является общеизвестным для специалистов в данной области, в контексте настоящего изобретения он означает развитие плодов без оплодотворения женского семязачатка. Для получения плодов не требуется процесс опыления, однако, вследствие отсутствия опыления плоды не имеют семян.

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления изобретения растения по настоящему изобретению дают бессемянные плоды.

Плоды растений по изобретению могут содержать семенообразные структуры. Эти семенообразные структуры, как правило, белые и мягкие по сравнению с семенами растений дикого типа, темно-

коричневыми или черными и твердыми. Семенообразные структуры в плодах растений по изобретению иногда именуются пустыми семенами. Однако они не являются настоящими семенами, поскольку они не содержат жизнеспособного зародыша, а представляют собой структуры, происходящие из покрова семязачатка.

В соответствии с более предпочтительным вариантом осуществления изобретения растения по настоящему изобретению дают бессемянные плоды и/или являются растениями с мужской фертильностью и/или имеют четную плоидность и/или являются стеноспермокарпическими. Еще более предпочтительно, растения по настоящему изобретению дают бессемянные плоды, являются растениями с мужской фертильностью, являются диплоидными (2n) или тетраплоидными (4n) и стеноспермокарпическими.

Термин "плод" в его ботаническом значении обычно означает структуру, содержащую семя, которая развивается из завязи цветков покрытосеменных.

Термин "бессемянный плод", обычно используемый в данной области, в частности в селекции, хотя это и не совпадает с ботаническим значением термина "плод", в контексте настоящего изобретения означает плоды без зрелых или жизнеспособных семян. Зрелые или жизнеспособные семена могут прорастать в почве в условиях, пригодных для соответствующего растения, и развиваться в растения. Этот тест может использоваться для определения того, дает ли растение бессемянные плоды. Бессемянные плоды не будут содержать семена, которые прорастут и вырастут в растение в условиях, пригодных для соответствующего растения.

Если известен причинный ген для получения бессемянных плодов, описанных в настоящем документе, в настоящее время с помощью различных известных способов можно получать растения, дающие бессемянные плоды. Эти способы могут основываться на получении и отборе растений, имеющих мутантные аллели, кодирующие нефункциональные циклин-SDS-подобные белки, или мутантные аллели, кодирующие циклин-SDS-подобные белки с пониженной функцией или с потерей функции, или на использовании обычных мутационных агентов, таких как химические вещества, излучение высокой энергии (например, рентгеновское излучение, нейтронное излучение, гамма-излучение или ультрафиолетовое излучение). С помощью методов геномной технологии также могут быть получены растения, имеющие нефункциональные циклин-SDS-подобные белки или циклин-SDS-подобные белки со сниженной активностью.

Растения по изобретению могут быть получены путем введения одной или нескольких мутаций в аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок.

Таким образом, еще один вариант осуществления изобретения относится к способу получения растения, при этом такой способ включает следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений;
- b) отбор растения с мужской фертильностью, дающего бессемянные плоды;
- c) проверку того, имеет ли растение, отобранное на этапе b), мутацию в аллеле гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, и, при необходимости,
- d) выращивание/культивирование растений, полученных на этапе c).

Таким образом, один аспект изобретения относится к способу получения растения, который включает следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений;
- b) отбор растения с мужской фертильностью, дающего бессемянные плоды;
- c) проверку того, имеет ли растение, отобранное на этапе b), мутацию в аллеле гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, и отбор растения, содержащего такую мутацию, и, при необходимости,
- d) выращивание/культивирование растений, полученных на этапе c), при этом аллель дикого типа гена кодирует циклин-SDS-подобный белок, включающий по меньшей мере 60% идентичности последовательности с любым из белков, выбранным из группы: SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 12, или SEQ ID NO: 19, или SEQ ID NO: 20.

Тем не менее, в соответствии с одним аспектом порядок этапов также может отличаться.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом предоставляется способ получения растения, который включает следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений;
- b) идентификацию растения, которое имеет мутацию в аллеле гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, и, при необходимости,
- c) определение того, является ли растение растением с мужской фертильностью, и дает ли растение или потомство растения, полученное путем самоопыления, бессемянные плоды.

При необходимости, способ включает отбор растения, включающего по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Наличие мутантного аллеля, если он присутствует в гомозиготной форме, приводит к образованию бессемянных плодов. Растение, включающее этот аллель, является растением с мужской фертильностью.

В соответствии с одним аспектом аллель дикого типа гена кодирует циклин-SDS-подобный белок, включающий по меньшей мере 60% идентичности последовательности с любым из белков, выбранным из группы: SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 12, или SEQ ID NO: 19, или SEQ ID NO: 20.

Кроме того, в вышеописанных способах (т.е. способах введения мутаций в популяцию растений) может исключаться этап а).

В контексте настоящего изобретения термин "популяция растений" означает цельные растения в количестве более одного и включает также части растения, плоды, семена или клетки растения. При этом части растения, плоды, семена или клетки растений в каждом случае получены из более чем одного растения, т.е. выражение "популяция частей растения, плодов, семян или клеток растения" означает части растения, плоды, семена или клетки растения, соответственно, которые получены не из одного растения, а из множества растений.

Химические вещества, которые можно использовать для получения химически индуцированных мутаций, и мутации, возникающие в результате действия соответствующих мутагенов, описаны, например, в документах Ehrenberg and Husain, 1981, (Mutation Research 86, 1-113), Müller, 1972 (Biologisches Zentralblatt 91 (1), 31-48). Получение мутантных растений риса с использованием гамма-излучения, этилметансульфоната (EMS), N-метил-N-нитрозомочевины или азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ) описано, например, в документах Jauhar and Siddiq (1999, Indian Journal of Genetics, 59 (1), 23-28), в Rao (1977, Cytologica 42, 443-450), Gupta and Sharma (1990, Oryza 27, 217-219) и Satoh and Omura (1981, Japanese Journal of Breeding 31 (3), 316-326). Получение мутантных растений пшеницы с использованием  $\text{NaN}_3$  или гидразида малеиновой кислоты описано в Agora et al. (1992, Annals of Biology 8 (1), 65-69). Обзор получения мутантных растений пшеницы с использованием различных видов излучения высокой энергии и химических веществ представлен в Scarascia-Mugnozza et al. (1993, Mutation Breeding Review 10, 1-28). В работе Svec et al. (1998, Cereal Research Communications 26 (4), 391-396) описано использование N-этил-N-нитрозомочевины для получения мутаций в тритикале. Использование MMS (метилметансульфоновой кислоты) и гамма-излучения для получения мутантов проса описано в Shashidhara et al. (1990, Journal of Maharashtra Agricultural Universities 15 (1), 20-23).

Описано получение мутантов тех видов растений, которые, в основном, размножаются вегетативно, например, для картофеля, который производит модифицированный крахмал (Hovenkamp-Hermelink et al. (1987, Theoretical and Applied Genetics 75, 217-221), а также для мяты с повышенным выходом масла или с модифицированным качеством масла (Dwivedi et al., 2000, Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22, 460-463).

Все эти способы, по существу, могут использоваться в способе получения растения для получения мутантных аллелей в генах, кодирующих циклин-SDS-подобный белок. В способе получения растения по настоящему изобретению предпочтительно мутантную популяцию получали с применением этилметансульфоната (СЭМ) к растениям или семенам растений для введения мутаций.

Отбор растений, дающих бессемянные плоды, может быть сделан путем простого визуального скрининга/фенотипирования плодов. Поскольку фенотип бессемянности наблюдается лишь в гомозиготном состоянии, перед фенотипированием предпочтительно осуществляется самоопыление популяции мутагенизированных растений. То, что растение дает фертильную пыльцу, может быть продемонстрировано, например, путем использования пыльцы с соответствующего растения для перекрестного опыления другого растения с женской фертильностью. В случае если семена, полученные в результате такого перекрестного скрещивания, являются жизнеспособными, то пыльца, использованная в перекрестных опылениях, была фертильной. Мутации в соответствующих аллелях, в частности, в аллелях генов, кодирующих циклин-SDS-подобный белок, могут быть обнаружены с помощью способов, известных специалистам. В частности, для этой цели могут использоваться анализы, основанные на гибридизации с использованием зондов (Саузерн-блоттинг), амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), секвенирования связанных геномных последовательностей и поиска отдельных нуклеотидных обменов. Способом идентификации мутаций на основе паттернов гибридизации является, например, поиск различий длины рестрикционных фрагментов (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) (Nam et al., 1989, The Plant Cell 1, 699-705; Leister and Dean, 1993, The Plant Journal 4 (4), 745-750). Примером способа на основании ПЦР является анализ различий в длинах амплифицированных фрагментов (полиморфизм длины амплифицированных фрагментов, AFLP, ПДАФ) (Castiglioni et al., 1998, Genetics 149, 2039-2056; Meksem et al., 2001, Molecular Genetics and Genomics 265, 207-214; Meyer et al., 1998, Molecular and General Genetics 259, 150-160). Для идентификации мутаций могут также использоваться исключенные амплифицированные фрагменты с использованием рестрикционных эндонуклеаз (полиморфизм рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК, CAPS) (Konieczny and Ausubel, 1993, The Plant Journal 4, 403-410; Jarvis et al., 1994, Plant Molecular Biology 24, 685-687; Bachem et al., 1996, The Plant Journal 9 (5), 745-753). Способы определения однонуклеотидного полиморфизма, помимо прочего, описаны в работах Qi et al. (2001, Nucleic Acids Research 29 (22), e116) Drenkard et al. (2000, Plant Physiology 124, 1483-1492) и Cho et al. (1999, Nature Genetics 23, 203-207). Особенно эффективно могут использоваться способы, которые позволяют в течение короткого времени проводить исследования нескольких растений на наличие мутаций в определенных генах. Такой способ, так называемый TILLING-анализ (поиск индуцированных локальных нарушений в геномах), описан McCallum et al. (2000, Plant Physiology 123, 439-442).

Специалистам известно, что в настоящее время также могут использоваться другие способы для идентификации растений и клеток растений по изобретению с мутантным аллелем гена, кодирующего

циклин-SDS-подобный белок. Эти способы включают, например, так называемые подходы прямого скрининга. При подходах прямого скрининга создается мутантная популяция. Растения мутантной популяции, например растения M2, подвергают скринингу на поиск растений, дающих бессемянные плоды, которые затем скрещивают с различными инбредными линиями для получения картирующей популяции. Затем картирующую популяцию анализируют известными специалистами способами для идентификации аллеля, вызывающего фенотип бессемянных плодов. Другие способы определения того, содержит ли клетка растения или растение мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, включают секвенирование соответствующих аллелей и анализ маркеров SNP с помощью известных специалистам методов, например, обсуждаемых в Thomson (2014, *Plant Breeding and Biotechnology* 2, 195-212).

Эти способы, по существу, могут использоваться для идентификации растений и клеток растений по изобретению с мутантным аллелем гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок.

Выращивание растений с мужской фертильностью, дающих бессемянные плоды, с мутантным аллелем гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, идентифицированного в способе получения растения по изобретению, можно осуществлять обычными способами, в теплице или в полевых условиях. Культивирование и/или размножение этих растений может осуществляться известными для специалистов способами, например, с помощью отростков, культур *in vitro*, клеток, протопластов, зародышей или каллюсов, или способами микроклонального размножения или путем прививки черенков к другому подвою.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения способы получения растения по настоящему изобретению используют для получения растений по настоящему изобретению. Предпочтительные варианты осуществления, описанные выше для растений по настоящему изобретению, соответственно применимы к способам получения растения по настоящему изобретению.

Растения, полученные/получаемые способом получения растений по настоящему изобретению, также являются вариантом осуществления изобретения.

Различные методы генной технологии предоставляют дополнительные возможности получения растений с мутантными аллелями гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, или с нефункциональными циклин-SDS-подобными белками или со сниженной активностью циклин-SDS-подобных белков или растений, демонстрирующих пониженную экспрессию циклин-SDS-подобных белков.

Все эти способы основаны на введении чужеродной или нескольких чужеродных молекул нуклеиновых кислот в геном растений или клеток растений и, следовательно, по существу, могут использоваться для идентификации растений и клеток растений по изобретению.

Таким образом, еще один вариант осуществления изобретения относится к способу получения растения, включающему следующие этапы:

а) введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в растение, при этом чужеродную молекулу нуклеиновой кислоты выбирают из группы, состоящей из следующих молекул:

i) молекул ДНК, которые кодируют по меньшей мере одну антисмысловую РНК, которая приводит к снижению экспрессии эндогенного гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок;

ii) молекул ДНК, которые в результате косупрессии приводят к снижению экспрессии эндогенного гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок;

iii) молекул ДНК, которые кодируют по меньшей мере один рибозим, который расщепляет специфические транскрипты эндогенного гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок;

iv) молекул ДНК, которые одновременно кодируют по меньшей мере одну антисмысловую РНК и по меньшей мере одну смысловую РНК, причем указанная антисмысловая РНК и указанная смысловая РНК образуют двухцепочечную молекулу РНК, которая вызывает снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок (технология RNAi);

v) молекул нуклеиновой кислоты, введенных посредством мутагенеза *in vivo*, которые приводят к мутации или вставке гетерологичной последовательности в эндогенный ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок, причем такая мутация или вставка вызывает снижение экспрессии гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, или приводит к синтезу неактивного циклин-SDS-подобного белка;

vi) молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитело, при этом такое антитело приводит к снижению активности эндогенного гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, вследствие связывания антитела с эндогенным циклин-SDS-подобным белком,

vii) молекул ДНК, которые содержат транспозоны, причем введение этих транспозонов приводит к мутации или вставке в эндогенный ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок, что приводит к снижению экспрессии эндогенного гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, или к синтезу неактивного циклин-SDS-подобного белка;

viii) молекул Т-ДНК, которые из-за вставки в эндогенный ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок, вызывают снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, или приводят к синтезу неактивного циклин-SDS-подобного белка, и/или

ix) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих эндонуклеазы с редким расщеплением, предпочтительно, мегануклеазу, TALEN или систему CRISPR/Cas,

- b) отбор растения, дающего бессемянные плоды, при необходимости,
- c) проверку того, имеет ли растение, отобранное на этапе b), сниженную активность циклин-SDS-подобного белка по сравнению с растениями дикого типа, в геном которых не были встроены чужеродные молекулы нуклеиновой кислоты, и, при необходимости,
- d) выращивание/культивирование растений, полученных на этапе c).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения способ по настоящему изобретению, включающий введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения, относится к способу получения растения с мужской фертильностью, что означает, что в этом способе осуществляют отбор растения с мужской фертильностью, дающего бессемянные плоды (на этапе b и/или c).

Снижение активности циклин-SDS-подобных белков в растениях или клетках растений по изобретению, или в способе по настоящему изобретению, включающем введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения, может обеспечиваться путем экспрессии антисмысловых или косупрессионных конструкторов.

Для ингибирования экспрессии генов с помощью антисмысловой технологии или технологии косупрессии можно использовать, например, молекулу ДНК, которая включает полную кодирующую последовательность для циклин-SDS-подобного белка, включая любые существующие фланкирующие последовательности, а также молекулы ДНК, которые включают лишь части кодирующей последовательности, причем длина этих частей должна быть достаточной для того, чтобы вызывать антисмысловой эффект или эффект косупрессии, соответственно, в клетках. Как правило, для этого могут использоваться последовательности длиной не менее 20 п.о. или 21 п.о. (или нуклеотидов), предпочтительно последовательности с минимальной длиной по меньшей мере 100 п.о. (или нуклеотидов), особенно предпочтительно по меньшей мере 500 п.о. (или нуклеотидов). Например, молекулы ДНК имеют длину 21-100 п.о. (или нуклеотидов), предпочтительно 100-500 п.о. (или нуклеотидов), особенно предпочтительно более 500 п.о. (или нуклеотидов).

Также для антисмысловых или косупрессорных препаратов могут использоваться последовательности ДНК, которые имеют высокую степень идентичности с эндогенными последовательностями, присутствующими в клетке растения, и которые кодируют циклин-SDS-подобные белки. Минимальная степень идентичности должна превышать приблизительно 65%, предпочтительно 80%. Предпочтительно используются последовательности с идентичностью по меньшей мере 90%, в частности с идентичностью в диапазоне 95-100%. Значение термина "идентичность последовательности" определено по тексту настоящего документа.

Кроме того, для достижения антисмыслового или косупрессорного эффекта также возможно использование интронов, т.е. некодирующих областей генов, которые кодируют циклин-SDS-подобные белки. Использование интронных последовательностей для ингибирования экспрессии генов, которые кодируют белки биосинтеза крахмала, описано, например, в международных патентных заявках WO 97/04112, WO 97/04113, WO 98/37213, WO 98/37214.

Специалисту известны способы достижения антисмыслового и косупрессивного эффекта. Например, метод подавления совместного подавления был описан в Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui and Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

Также специалистам известна экспрессия рибозимов для снижения активности определенных ферментов в клетках и описана, например, в EP-B1 0321201. Экспрессия рибозимов в растительных клетках описана, например, в Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250, (1996), 329-338).

Снижение активности циклин-SDS-подобных белков в растениях или клетках растений по изобретению, или в способе по настоящему изобретению, включающем введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения, также может обеспечиваться путем одновременной экспрессии смысловых и антисмысловых молекул РНК (технология РНК-интерференции) соответствующего целевого гена, который подвергается репрессии, предпочтительно гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок.

Это может быть обеспечено, например, с использованием химерных конструкторов, которые содержат "инвертированные повторы" соответствующего целевого гена или его частей. В этом случае специфические конструкторы кодируют молекулы смысловой и антисмысловой РНК соответствующего целевого гена. Синтез *in planta* смысловой и антисмысловой РНК в виде молекулы РНК происходит одновременно, при этом смысловая и антисмысловая РНК отделены друг от друга спейсером и способны образовывать двухцепочечную молекулу РНК.

Было продемонстрировано, что введение инвертированных повторных ДНК-конструкторов в геном растений или клеток растений является высокоэффективным методом репрессии генов, соответствующих инвертированным повторным ДНК-конструкторам (Waterhouse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, (1998), 13959-13964; Wang and Waterhouse, Plant Mol. Biol. 43, (2000), 67-82; Singh et al., Biochemical Society Transactions, том 28 часть 6 (2000), 925-927; Liu et al., Biochemical Society Transactions, том 28 часть 6 (2000), 927-929; Smith et al., (Nature 407, (2000), 319-320; международная патентная заявка WO

99/53050 A1). Смысловые и антисмысловые последовательности целевого гена или генов также могут экспрессироваться отдельно друг от друга с использованием сходных или различных промоторов (Nap, J-P et al., 6th International Congress of Plant Molecular Biology, Quebec, 18-24-го июня, 2000; Poster S7-27, Presentation Session S7). Таким образом, снижение активности циклин-SDS-подобных белков в растениях или клетках растений по изобретению также может быть достигнуто путем получения двухцепочечных молекул РНК. Для этого в геном растений предпочтительно вводят "инвертированные повторы" молекул ДНК генов, кодирующих циклин-SDS-подобный белок, или кДНК, причем молекулы ДНК (ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок, или кДНК или фрагменты этих генов или кДНК), которые должны быть транскрибированы, находятся под контролем промотора, контролирующего экспрессию указанных молекул ДНК.

Таким образом, фрагменты любой из молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих циклин-SDS-подобные белки, также являются аспектом изобретения. Такие фрагменты могут использоваться по-разному, например в качестве праймеров или зондов, или они могут быть встроены в векторы трансформации и использованы для получения растений, дающих бессемянные плоды.

Такие фрагменты молекул нуклеиновых кислот, кодирующие циклин-SDS-подобные белки, могут иметь различные размеры, например по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, при по меньшей мере 400, по меньшей мере 500 нуклеотидов или более.

Кроме того, известно, что образование двухцепочечных молекул РНК из промоторных молекул ДНК в растениях *in trans* может приводить к метилированию и транскрипционной инактивации гомологических копий этих промоторов, которые именуются далее целевыми промоторами (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). Таким образом, можно уменьшить экспрессию определенного целевого гена (например, гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок), который в природе находится под контролем этого целевого промотора, путем дезактивации целевого промотора. Это означает, что в этом случае молекулы ДНК, которые включают целевые промоторы репрессируемых генов (целевых генов), в отличие от исходной функции промоторов в растениях, не используются в качестве контрольных элементов для экспрессии генов или кДНК, но сами используются в качестве транскрибируемых молекул ДНК.

Для получения двухцепочечных молекул РНК целевого промотора *in planta*, которые могут встречаться в виде шпилечных молекул РНК, предпочтительно используются конструкторы, которые содержат "инвертированные повторы" молекул ДНК целевого промотора, при этом молекулы ДНК целевого промотора находятся под контролем промотора, контролирующего генную экспрессию указанных молекул ДНК целевого промотора. Эти конструкторы затем вводятся в геном растений. Экспрессия "инвертированных повторов" указанных молекул ДНК целевого промотора *in planta* приводит к образованию двухцепочечных молекул РНК целевого промотора (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). С помощью этого способа может быть инактивирован целевой промотор. Таким образом, снижение активности циклин-SDS-подобных белков в растениях или клетках растений по изобретению также может быть достигнуто путем введения двухцепочечных молекул РНК промоторных последовательностей гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, в клетки растений или растения. Для этого в геном растений предпочтительно вводят "инвертированные повторы" промоторных молекул ДНК генов, кодирующих циклин-SDS-подобный белок, причем молекулы ДНК целевого промотора (промотора гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок), которые должны быть транскрибированы, находятся под контролем промотора, контролирующего экспрессию указанных молекул ДНК целевого промотора.

Для ингибирования экспрессии генов с помощью одновременной экспрессии молекул смысловой и антисмысловой РНК (технология РНК-интерференции) можно использовать, например, молекулу ДНК, которая включает полную кодирующую последовательность для циклин-SDS-подобного белка, включая любые существующие фланкирующие последовательности, а также молекулы ДНК, которые включают лишь части кодирующей последовательности, причем длина этих частей должна быть достаточной для того, чтобы вызывать так называемый эффект РНК-интерференции в клетках. Части гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, могут быть выбраны из кодирующих последовательностей, нетранслируемых последующих и предшествующих последовательностей, интронов, промоторов и/или энхансеров. Как правило, для этого могут использоваться последовательности длиной не менее 20 п.о. (или нуклеотидов), предпочтительно последовательности с минимальной длиной по меньшей мере 25 п.о. (или нуклеотидов), особенно предпочтительно по меньшей мере 50 п.о. (или нуклеотидов). Например, молекулы ДНК имеют длину 20-25 п.о. (или нуклеотидов), предпочтительно 26-50 п.о. (или нуклеотидов), особенно предпочтительно более 50 п.о. (или нуклеотидов).

Также для одновременной экспрессии молекул смысловой и антисмысловой РНК (технология РНК-интерференции) могут использоваться последовательности ДНК, которые имеют высокую степень идентичности с эндогенными последовательностями, присутствующими в клетках растений, и которые кодируют циклин-SDS-подобный белок. Минимальная степень идентичности должна превышать приблизительно 65%, предпочтительно 80%. Предпочтительно используются последовательности с идентичностью по меньшей мере 90%, в частности, с идентичностью в диапазоне 95-100%. Последовательности,

которые содержат последовательные фрагменты нуклеотидных последовательностей, состоящие из нуклеотидной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, могут особенно эффективно использоваться для ингибирования генов, кодирующих циклин-SDS-подобный белок, с помощью технологии РНК-интерференции.

Снижение активности циклин-SDS-подобных белков в растениях или клетках растений по изобретению, или в способе по настоящему изобретению, включающем введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения, может обеспечиваться путем так называемого "мутагенеза *in vivo*", при котором в клетки растений вводится гибридный олигонуклеотид РНК-ДНК (химеропласт) (Kipp, P.B. et al., Poster Session at the "5<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, 21-27-го сентября 1997, Singapore; R.A. Dixon and C.J. Arntzen, отчет о встрече по "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; международная заявка на изобретение WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et al., 1999, PNAS 96, 8774-8778).

Часть компонентов ДНК олигонуклеотида РНК-ДНК является гомологичной к нуклеотидной последовательности эндогенного гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, однако по сравнению с нуклеотидной последовательностью эндогенного гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, она имеет мутацию или содержит гетерологичную область, которая окружена гомологичными областями. Путем спаривания оснований гомологичных областей олигонуклеотида РНК-ДНК и молекулы эндогенной нуклеиновой кислоты с последующей гомологичной рекомбинацией в геном клетки растения может быть перенесена область мутации или гетерологичная область, содержащаяся в компонентах ДНК олигонуклеотида РНК-ДНК. Это приводит к снижению активности одного или нескольких циклин SDS-подобных белков.

Снижение активности циклин-SDS-подобных белков в растениях или клетках растений по изобретению, или в способе по настоящему изобретению, включающем введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения, может обеспечиваться путем введения молекул нуклеиновых кислот, кодирующей антагонисты/ингибиторы циклин-SDS-подобных белков, в клетку растения. Специалистам известно, что снижения активности циклин-SDS-подобных белков можно достичь путем экспрессии нефункциональных производных таких белков, в частности транс-доминантных мутаций таких белков, и/или посредством экспрессии антагонистов/ингибиторов таких белков. Антагонисты/ингибиторы таких белков включают, например антитела, фрагменты антител или молекулы с аналогичными характеристиками связывания. Например, для модуляции активности белка фитохрома А в генетически модифицированных растениях табака использовали цитоплазматическое антитело scFv (Owen, Bio/Technology 10 (1992), 790-4; Review: Franken E., Teuschel U. and Hain R., Current Opinion in Biotechnology 8, (1997), 411-416; Whitlam, Trends Plant Sci. 1 (1996), 268-272; Conrad and Manteufel, Trends in Plant Science 6, (2001), 399-402; De Jaeger et al., Plant Molecular Biology 43, (2000), 419-428). Снижение активности ветвящегося фермента в растениях картофеля путем экспрессии специфического антитела было описано в работе Jobling et al. (Nature Biotechnology 21, (2003), 77-80). В данном случае для антитела предоставлялась целевая плазмидная последовательность для обеспечения ингибирования белков, локализованных в пластидах.

Снижение активности циклин-SDS-подобных белков в растениях или клетках растений по изобретению, или в способе по настоящему изобретению, включающем введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения, может обеспечиваться путем введения в клетку растения молекул нуклеиновых кислот, содержащих транспозонные последовательности. Вставка транспозонных последовательностей в последовательность эндогенного гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, будет вызывать снижение экспрессии эндогенного циклин-SDS-подобного белка.

Такие транспозоны могут быть эндогенными транспозонами (гомологичными растению), а также транспозонами, которые не встречаются в природе в указанной клетке (гетерологичными для растения), однако в каждом случае они вводятся в растение или в клетку растения с использованием методов генной инженерии, например, путем трансформации клетки. Специалистам в данной области известны способы изменения экспрессии генов с помощью транспозонов. Обзор использования эндогенных и гетерологичных транспозонов в качестве инструментов биотехнологии растений представлен в Ramachandran and Sundaresan (2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252). Возможность определения мутаций, в которых специфические гены были инактивированы инсерционным мутагенезом со вставкой транспозона, представлена в обзоре Maes et al. (1999, Trends in Plant Science 4 (3), 90-96). Получение рисовых мутантов с помощью эндогенных транспозонов описано в работе Hirochika (2001, Current Opinion in Plant Biology 4, 118-122). Идентификация генов кукурузы с помощью эндогенных ретротранспозонов описана, например, в работе Hanley et al. (2000, The Plant Journal 22 (4), 557-566). Возможность получения мутантов с помощью ретротранспозонов и методы идентификации мутантов описаны Kumar and Hirochika (2001, Trends in Plant Science 6 (3), 127-134). Активность технологических (искусственных) транспозонов у разных видов была описана как для двудольных, так и для однодольных растений: например, для риса (Greco et al., 2001, Plant Physiology 125, 1175-1177; Liu et al., 1999, Molecular and General Genetics 262, 413-420; Hiroyuki et al., 1999, The Plant Journal 19 (5), 605-613; Jeon und Gynheung, 2001, Plant Science 161,

211-219), ячменя (2000, Koprek et al., *The Plant Journal* 24 (2), 253-263) *Arabidopsis thaliana* (Aarts et al., 1993, *Nature* 363, 715-717, Schmidt und Willmitzer, 1989, *Molecular and General Genetics* 220, 17-24; Altmann et al., 1992, *Theoretical and Applied Genetics* 84, 371-383; Tissier et al., 1999, *The Plant Cell* 11, 1841-1852), томата (Belzile und Yoder, 1992, *The Plant Journal* 2 (2), 173-179) и картофеля (Frey et al., 1989, *Molecular and General Genetics* 217, 172-177; Knapp et al., 1988, *Molecular and General Genetics* 213, 285-290).

В целом, растения и клетки растений по изобретению могут быть получены с помощью гомологических и гетерологических транспозонов.

В связи с настоящим изобретением растения и клетки растений по изобретению также могут быть получены с использованием так называемого инсерционного мутагенеза (обзорная статья: Thorneycroft et al., 2001, *Journal of experimental Botany* 52 (361), 1593-1601). Снижение активности циклин-SDS-подобных белков в растениях или клетках растений по изобретению, или в способе по настоящему изобретению, включающем введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения, может обеспечиваться путем введения молекул нуклеиновых кислот, включающей последовательности Т-ДНК, в клетку растения.

Инсерционный мутагенез (путем инсерции Т-ДНК) основан на том, что определенные отделы (Т-ДНК) Ti-плазмид из *Agrobacterium* могут быть встроены в геном клеток растений. Место встраивания в хромосому растения не определено, оно может происходить в любой точке. Если Т-ДНК встраивается в часть хромосомы, которая выполняет функцию гена, то это может привести к изменению экспрессии гена и, следовательно, к изменению активности белка, кодируемого соответствующим геном. В частности, встраивание Т-ДНК в кодирующую область белка часто приводит к тому, что соответствующий белок больше не может синтезироваться или не синтезируется в активной форме соответствующей клеткой. Использование вставок Т-ДНК для получения мутантов описано, например, для *Arabidopsis thaliana* (Krysan et al., 1999, *The Plant Cell* 11, 2283-2290; Atipiroz-Leehan and Feldmann, 1997, *Trends in genetics* 13 (4), 152-156; Parinov and Sundaresan, 2000, *Current Opinion in Biotechnology* 11, 157-161) и риса (Jeon and An, 2001, *Plant Science* 161, 211-219; Jeon et al., 2000, *The Plant Journal* 22 (6), 561-570). Способы идентификации мутантов, которые были получены с помощью инсерционного мутагенеза путем вставок Т-ДНК описаны, помимо прочего, в работе Young et al., (2001, *Plant Physiology* 125, 513-518), Parinov et al. (1999, *The Plant cell* 11, 2263-2270), Thorneycroft et al. (2001, *Journal of Experimental Botany* 52, 1593-1601), и McKinney et al. (1995, *The Plant Journal* 8 (4), 613-622).

Мутанты, полученные использованием вставок Т-ДНК, получали в большом количестве, например, для *Arabidopsis thaliana* и доступны в различных коллекциях культур ("музеях культур", например, Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, <http://signal.salk.edu/>).

Мутагенез Т-ДНК, в целом, может использоваться для получения растений и клеток растений по изобретению со сниженной активностью циклин-SDS-подобного белка.

В контексте настоящего изобретения термин "чужеродная молекула нуклеиновой кислоты" означает такую молекулу нуклеиновой кислоты, которая либо не встречается в природе в соответствующих растениях или клетках растений дикого типа, либо не встречается в природе в таком специфическом пространственном расположении в растениях или клетках растений дикого типа, или такая молекула нуклеиновой кислоты локализована в таком месте в геноме растения или клетки растения, в котором оно не встречается в природе. Предпочтительно молекула чужеродной нуклеиновой кислоты представляет собой рекомбинантную молекулу, которая состоит из различных элементов, комбинация или специфическое пространственное расположение которых не встречается в природе в растениях или в клетках растений.

В принципе, чужеродной молекулой нуклеиновой кислоты может быть любая молекула нуклеиновой кислоты, которая приводит к снижению активности циклин-SDS-подобного белка. Такие молекулы нуклеиновой кислоты описаны выше в настоящем документе.

В контексте настоящего изобретения термин "геном" означает всю совокупность генетического материала, присутствующего в клетке растения. Специалистам известно, что наряду с клеточным ядром генетический материал также содержат другие компартменты (например, пластиды, митохондрии).

Существует большое количество методик введения ДНК в растительную клетку-хозяина. Эти техники включают трансформацию клеток растений с помощью Т-ДНК с использованием *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes* в качестве средства трансформации, слияние протопластов, инъекция нуклеиновых кислот, электропорация нуклеиновых кислот, введение нуклеиновых кислот с помощью биолистического подхода, а также другие способы.

Проводилось большое количество исследований использования агробактериальной трансформации клеток растений, оно подробно описано в работе EP 120516; Hoekema, IN: *The Binary Plant Vector System* Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V.; Fraley et al., *Crit. Rev. Plant Sci.* 4, 1-46 и An et al. *EMBO J.* 4, (1985), 277-287. Трансформация картофеля описана, например, в Rocha-Sosa et al., *EMBO J.* 8, (1989), 29-33.

Также описана трансформация однодольных растений с помощью векторов на основании агробактериальной трансформации (Chan et al., *Plant Mol. Biol.* 22, (1993), 491-506; Hiei et al., *Plant J.* 6, (1994)

271-282; Deng et al., *Science in China* 33, (1990), 28-34; Wilmonk et al., *Plant Cell Reports* 11, (1992), 76-80; May et al., *Bio/Technology* 13, (1995), 486-492; Conner and Domisse, *Int. J. Plant Sci.* 153 (1992), 550-555; Ritchie et al., *Transgenic Res.* 2, (1993), 252-265). Альтернативной системой трансформации однодольных растений является трансформация с помощью биолистического подхода (Wan and Lemaux, *Plant Physiol.* 104, (1994), 37-48; Vasil et al., *Bio/Technology* 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., *Plant Mol. Biol.* 24, (1994), 317-325; Spencer et al., *Theor. Appl. Genet.* 79, (1990), 625-631), трансформация протопластов, электропорация частично проницаемых клеток и введение ДНК с помощью стеклянных волокон. В частности, в литературе многократно описаны трансформация кукурузы (см., например, WO 95/06128, EP 0513849, EP 0465875, EP 0292435; Fromm et al., *Biotechnology* 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* 2, (1990), 603-618; Koziel et al., *Biotechnology* 11 (1993), 194-200; Moroc et al., *Theor. Appl. Genet.* 80, (1990), 721-726). Успешная трансформация других видов зерновых также описана, например, для ячменя (Wan and Lemaux, see above; Ritala et al., see above; Krens et al., *Nature* 296, (1982), 72-74) и пшеницы (Nehra et al., *Plant J.* 5, (1994), 285-297; Becker et al., 1994, *Plant Journal* 5, 299-307). Все вышеперечисленные способы могут использоваться в рамках настоящего изобретения. Методы трансформации овощных растений известны специалистам. В работе Curtis (2012, Springer Science & Business Media, ISBN: 1402023332, 9781402023330), помимо прочего, описаны способы трансформации кофе, ананаса, груши, редиса, моркови, гороха, капусты, цветной капусты и арбуза.

Трансформация овощных культур, таких как банан, цитрусовые, манго, папайя, арбуз, авокадо, виноград, (сладкая) дыня, киви, кофе, какао описана в работе Pua and Davey (2007, Springer Science & Business Media, ISBN: 3540491619, 9783540491613).

Для экспрессии молекул нуклеиновых кислот, например молекул нуклеиновых кислот, обеспечивающих эффект сайленсинга генов или используемых для введения мутаций в аллель в растениях или клетках растения, такие нуклеиновые кислоты предпочтительно связываются с регуляторными последовательностями ДНК, включая те последовательности ДНК, которые иницируют транскрипцию в клетках растений (промоторы). В то же время промотор может быть выбран таким образом, чтобы экспрессия происходила конститутивно или только в определенной ткани, на определенной стадии развития растения или во время, определяемое внешними воздействиями. Промотор может быть гомологичным или гетерологичным как по отношению к растению, так и по отношению к молекуле нуклеиновой кислоты. Таким образом, эти молекулы нуклеиновой кислоты обычно не встречаются в природе в растениях, но представляют собой рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, что означает, что комбинация различных генетических элементов (например, кодирующих последовательностей, комплементарной последовательности РНКи, промоторов), содержащихся в молекуле нуклеиновой кислоты, не присутствует в этой комбинации в природе.

Соответствующие промоторы обычно известны специалистам, например промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты и убиквитиновый промотор из кукурузы для конститутивной экспрессии, промотор пататина В33 (Rocha-Sosa et al., *EMBO J.* 8 (1989), 23-29) для специфичной для клубней экспрессии в картофеле или промотор, обеспечивающий экспрессию только в фотосинтетически активных тканях, например промотор ST-LS1 (Stockhaus et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., *EMBO J.* 8 (1989), 2445-2451) или, для эндоспермспецифической экспрессии промотора HMG из пшеницы, промотор USP, промотор фазеолина, промоторы генов зеина из кукурузы (Pedersen et al., *Cell* 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio et al., *Plant Mol. Biol.* 15 (1990), 81-93), промотор глютелина (Leisy et al., *Plant Mol. Biol.* 14 (1990), 41-50; Zheng et al., *Plant J.* 4 (1993), 357-366; Yoshihara et al., *FEBS Lett.* 383 (1996), 213-218) или промотор shrunken-1 (Werr et al., *EMBO J.* 4 (1985), 1373-1380). Однако могут также использоваться промоторы, активируемые лишь в то время, которое определяется внешними воздействиями (см., например, WO 9307279). В настоящем случае особый интерес могут представлять промоторы белков теплового шока, которые могут обеспечивать простую индукцию. Кроме того, можно использовать промоторы, специфичные для семян, такие как промотор USP из *Vicia faba*, который гарантирует специфическую для семян экспрессию в *Vicia faba* и других растениях (Fiedler et al., *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 669-679; Bäumlein et al., *Mol. Gen. Genet.* 225 (1991), 459-467).

Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты также может содержать терминатор (сигнал полиаденилирования), который используется для добавления поли(А)-хвоста к транскрипту. Функция стабилизации транскриптов приписывается поли(А)-хвосту. Элементы такого типа описаны в литературе (cf. Gielen et al., *EMBO J.* 8 (1989), 23-29) и могут по желанию быть взаимозаменяемыми.

Также могут присутствовать интронные последовательности, например, между промотором и кодирующей областью. Такие интронные последовательности могут приводить к стабильности экспрессии и увеличению экспрессии в растениях (Callis et al., 1987, *Genes Devel.* 1, 1183-1200; Luehrsen, and Walbot, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 225, 81-93; Rethmeier et al., 1997, *Plant Journal.* 12(4): 895-899; Rose and Beliakoff, 2000, *Plant Physiol.* 122 (2), 535-542; Vasil et al., 1989, *Plant Physiol.* 91, 1575-1579; XU et al., 2003, *Science in China Series C* том 46 No.6, 561-569). Подходящими интронными последовательностями являются, например, первый интрон гена sh1 из кукурузы, первый интрон гена 1 полиубиквитина из кукурузы, первый интрон гена *erpsr* из риса или один из двух первых интронов гена PAT1 из *Arabidopsis*.

То, что в настоящем документе указано относительно проверки того, имеет ли растение мутацию в

нуклеотидной последовательности или в гене или аллеле, кодирующем циклин-SDS-подобный белок, и для выращивания/культивирования растений для осуществления способа получения растения по изобретению, в соответствии с изобретением также применимо для способа, включающего введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения способы получения растения по настоящему изобретению и способ по настоящему изобретению, включающий введение молекулы чужеродной нуклеиновой кислоты в клетку растения, включают дополнительный этап, включающий получение дополнительных растений из растений, полученных на этапе d) в соответствии со способами по настоящему изобретению. Дополнительные полученные растения отличаются тем, что они содержат по меньшей мере один мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, или что они обладают сниженной активностью циклин-SDS-подобного белка из-за введения молекулы чужеродной нуклеиновой кислоты в соответствии с описанием выше. Эти дополнительные растения могут быть получены посредством вегетативного (бесполого) или генеративного (полового) размножения. Для вегетативного размножения могут использоваться, например, черенки, культуры ткани *in vitro*, клетки, протопласты, зародыши или каллусы, материал для микрклонального размножения, корневища или клубни. Другой материал для размножения включает, например, плоды, семена, сеянцы, которые являются гетерозиготными или гомозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, и т.д.

Способы вегетативного (бесполого) размножения, в том числе микрклональное размножение растений известны специалистам и описаны, например, для банана, цитрусовых, манго, папайи, авокадо, (сладкой) дыни в работе Pua and Davey (2007, Springer Science & Business Media, ISBN: 3540491619, 9783540491613). Для арбуза различные способы культивирования тканей и микрклонального размножения описаны, например, в работе Sultana and Rhaman (2012, LAP Lambert Academic Publishing, ISBN-13: 978-3-8484-3937-9).

Растения, полученные/получаемые способом по настоящему изобретению, включающему введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения, также являются вариантом осуществления изобретения.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к способу размножения растения, дающего бессемянные плоды, включающему следующие этапы:

- a) получение семян, из которых выращивают растения по настоящему изобретению, или получение семян под номером доступа NCIMB 42532 или их потомства,
- b) выращивание растений из семян, полученных на этапе a),
- c) отбор растений, дающих бессемянные плоды, из растений, выращиваемых на этапе b),
- d) размножение растений, отобранных на этапе c), способом, выбранным из группы, состоящей из следующих способов:
  - i) прививание частей растений, отобранных на этапе c), к другому подвою,
  - ii) культивирование частей растений, отобранных на этапе c), в тканевой культуре *in vitro* и, при необходимости, регенерация новых растений из тканевой культуры,
  - iii) при необходимости, получение зародышевых культур или культур каллусов из частей растений, отобранных на этапе c), и, при необходимости, регенерацию новых растений из тканевой культуры,
  - iv) при необходимости, получение дополнительных растений техниками микрклонального размножения.

Размножение частей растений путем прививки и размножения и, при необходимости, регенерация растений способами тканевой культуры хорошо известны специалистам. Такие способы описаны в различных научных публикациях и рассмотрены и обобщены в ряде научных книг, таких как, например, Smith (2012, Academic Press, ISBN-13: 978-0124159204), Gayatri & Kavyashree (2015, Alpha Science International Ltd, ISBN-13: 978-1842659618) и т.д. Для арбуза соответствующие способы описаны, например, Sultana and Rhaman (2012, LAP Lambert Academic Publishing, ISBN-13: 978-3848439379).

Растения или части растений, полученные/получаемые способом размножения растений по настоящему изобретению, которые дают бессемянные плоды, также являются вариантом осуществления изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения для получения растений по настоящему изобретению используют все способы получения растения по настоящему изобретению или, при необходимости, способы размножения растений по настоящему изобретению, дающих бессемянные плоды, которые описаны в настоящем документе.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к материалу для размножения растений по настоящему изобретению и/или к материалу для размножения растений, включающему клетки растений, по настоящему изобретению, или к материалу для размножения растений, получаемому/полученному способом по настоящему изобретению для получения растений или материала для размножения растений, получаемого/полученного способом по изобретению, включающим введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения или в материал для размножения растений, получаемый/полученный из растения, которое, при необходимости, получают способом размножения растений, дающих

бессемянные плоды по настоящему изобретению. Частный вариант осуществления изобретения относится к материалу для размножения растений, получаемых/полученных из семян с номером доступа NCIMB 42532, предпочтительно к материалу для размножения тех растений, получаемых/полученных из семян с номером доступа NCIMB 42532, которые являются гетерозиготными или гомозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Также в объем изобретения входит материал размножения растений, гетерозиготных или гомозиготных по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, при этом такой материал для размножения получают/может быть получен из растений, которые получают в результате скрещивания растения, полученного из семян с номером доступа NCIMB 42532, с другим растением.

В настоящем документе термин "материал для размножения" включает те компоненты растения, которые пригодны для получения потомства вегетативным (бесполом) или генеративным (половым) путем. Для вегетативного размножения могут использоваться, например, черенки, культуры ткани *in vitro*, клетки, протопласты, зародыши или каллусы, материал для микроклонального размножения, корневища или клубни. Другой материал для размножения включает, например, плоды, семена, сеянцы, которые являются гетерозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, и т.д. В соответствии с одним аспектом материал для размножения представляет собой черенки, размножение которых осуществляется, например, путем их прививки к другому подвою или материалу тканевой культуры *in vitro*, в частности к зародышевым культурам. Особенно предпочтительным является материал для размножения в виде материала для тканевых культур *in vitro*, в частности зародышевые культуры *in vitro*. В настоящем документе растение, полученное вегетативным размножением, также именуется вегетативно размножающимся растением. В частности, растения, в которых мутантный циклин-SDS-подобный аллель присутствует в гомозиготной форме, предпочтительно размножаются вегетативно (так как их плоды являются бессемянными).

Еще один вариант осуществления изобретения относится к частям растений по настоящему изобретению и/или частям растений, включающим клетки растений по настоящему изобретению, или частям растений, получаемым/полученным способом по настоящему изобретению для получения растений или частей растений, получаемых/полученных способом по изобретению, включающим введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения или в части растений, получаемых/полученных из растения, получаемого, при необходимости, способом размножения растений, дающих бессемянные плоды, по настоящему изобретению. Еще один вариант осуществления изобретения относится к частям растений, получаемых/полученных из семян с номером доступа NCIMB 42532 (или из их потомства), предпочтительно к частям тех растений, получаемых/полученных из семян с номером доступа NCIMB 42532 (или из их потомства), которые являются гетерозиготными или гомозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Также в объем изобретения входят части растений, гетерозиготных или гомозиготных по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, при этом такие части растений получены/могут быть получены из растений, происходящих в результате скрещивания растения, полученного из семян с номером доступа NCIMB 42532, с другим растением.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к способу получения бессемянных плодов, включающему выращивание растения по настоящему изобретению и/или растения, содержащего клетки растений по настоящему изобретению, или выращивание растения, получаемого/полученного способом получения растений по настоящему изобретению, или выращивание плодов растений, получаемых/полученных способом по изобретению, включающим введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения или выращивание растения, получаемого/полученного способом размножения растений, дающих бессемянные плоды, по настоящему изобретению на поле или в теплице (например, в застекленной теплице, туннельной теплице или в сеточном доме), который обеспечивает опыление растения и сбор бессемянных плодов. Предпочтительно растение, выращиваемое в соответствии со способом получения бессемянных плодов по настоящему изобретению, является гомозиготным по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок.

Неожиданно было обнаружено, что в результате опыления растений, содержащих мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, в гомозиготном состоянии, пыльцой из другого растения растение будет давать бессемянные плоды. Не имеет существенного значения, опыляется ли дыхальце растения, гомозиготного по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, пыльцой, содержащей мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, или пыльцой, содержащей аллель дикого типа гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. В любом случае, независимо от генотипа пыльцы, женское растение, являющееся гомозиготным по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, дает бессемянные плоды. Растения по настоящему изобретению, которые являются гомозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, дают бессемянные плоды даже при перекрестном опылении пыльцой растений дикого типа. Таким образом, при культивировании растений по настоящему изобретению в любом случае будут получены бессемянные плоды.

В контексте настоящего изобретения термин "теплица" означает здание или помещение, которое

используют для выращивания растений, крыша и стенки которого выполнены из прозрачного материала, состоящего из стекла, пластика, полиэтилена, взора, марли или подобных материалов. Теплицы могут быть дополнительно снабжены техническим оборудованием для обогрева, охлаждения, затенения, автоматического полива, удобрения, регулирования концентрации углекислого газа и т.д., или могут не иметь такого оборудования. Термин "теплица", используемый в данном документе, включает теплицы с любым типом технического оборудования.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к плодам растений по настоящему изобретению или к плодам, полученные/получаемые из растений по настоящему изобретению, или к плодам, включающим клетки растений по настоящему изобретению, или к плодам растений, полученные/получаемые способом получения растений или плодов растений, полученные/получаемые способом по настоящему изобретению, включающим введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения или в плоды растений, полученные/получаемые из растения, которое получают/можно получить способом размножения растений, дающих бессемянные плоды, или способом получения плодов, полученные/получаемые способом получения бессемянных плодов по настоящему изобретению. Еще один вариант осуществления изобретения относится к плодам растений, получаемых/полученных из семян с номером доступа NCIMB 42532 (или из их потомства), предпочтительно к плодам тех растений, получаемых/полученных из семян с номером доступа NCIMB 42532 (или из их потомства), которые являются гетерозиготными или гомозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Также в объем изобретения входят плоды, гетерозиготные или гомозиготные по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, при этом такие плоды получают/могут быть получены из растений, которые получают в результате скрещивания растения, полученного из семян с номером доступа NCIMB 42532, с другим растением. Плоды могут быть гетерозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, и давать плоды с семенами, или могут быть гомозиготными по аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, и давать бессемянные плоды. Плоды, являющиеся гетерозиготными по аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, могут быть использованы для размножения растений, содержащих мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Предпочтительно плоды по изобретению гомозиготны по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, и/или дают бессемянные плоды. Логично, что бессемянные плоды не могут использоваться для дальнейшего выращивания растений из этих плодов. Таким образом, один вариант осуществления изобретения относится к плоду по изобретению, который представляет собой бессемянный плод, который не может использоваться для размножения.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к использованию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей циклин-SDS-подобный белок, выбранный из группы, состоящей из:

а) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белок с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 12, или SEQ ID NO: 19, или SEQ ID NO: 20;

б) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белок, последовательность которого имеет идентичность по меньшей мере 58% или по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% или особенно предпочтительно по меньшей мере 95% с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 12, или SEQ ID NO: 19, или SEQ ID NO: 20;

с) молекул нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеотидную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 17, или комплементарную последовательность;

д) молекул нуклеиновых кислот, которые имеют идентичность по меньшей мере 58% или по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% или особенно предпочтительно по меньшей мере 95% с последовательностью нуклеиновой кислоты, описанной под пунктом с);

е) молекул нуклеиновых кислот, которые гибридизируют по меньшей мере с одной нитью молекул нуклеиновых кислот, описанных в пунктах а), б), с) или д) в жестких условиях;

ф) молекул нуклеиновых кислот, нуклеотидная последовательность которых отличается от последовательности молекул нуклеиновых кислот, описанных в пунктах а) или б), вследствие вырожденности генетического кода; и

г) молекул нуклеиновых кислот, которые представляют фрагменты, аллельные варианты и/или производные молекул нуклеиновых кислот, описанных в пунктах а), б), с) или д) для получения растения, дающего бессемянные плоды.

В предпочтительном варианте применения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей циклин-SDS-подобный белок, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, используют для получения растений по настоящему изобретению; в частном предпочтительном варианте осуществления, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, использу-

ют для получения растений, дающих бессемянные плоды по настоящему изобретению.

В других предпочтительных вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую циклин SDS-подобный белок, используют для получения части растения по настоящему изобретению или плода по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления изобретения молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, используют в соответствии с любым из способов по изобретению, описанных в настоящем документе. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие циклин-SDS-подобный белок, могут, например, использоваться в способе по настоящему изобретению для получения растения или в способе по изобретению, включающему введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку растения, или в способе размножения растений, дающих бессемянные плоды, по настоящему изобретению или в способе получения бессемянных плодов по настоящему изобретению.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, используют для идентификации того, содержит ли растение или клетка растения мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, или того, синтезирует ли растение или клетка растения мутантную мРНК, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, или того, имеет ли растение или клетка растения сниженную активность циклин-SDS-подобного белка. Предпочтительно молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, используют для идентификации того, содержит ли растение, дающее бессемянные плоды, мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, или того, синтезирует ли растение мутантную мРНК, кодирующую циклин-SDS-подобный белок, или того, имеет ли растение сниженную активность циклин-SDS-подобного белка. Способы идентификации таких растений описаны в настоящем документе выше, и применяются соответствующим образом.

Предпочтительные варианты осуществления изобретения, относящиеся к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим циклин-SDS-подобные белки, описаны в настоящем документе выше и применяются соответствующим образом.

В соответствии с одним аспектом предоставляется способ скрининга для идентификации и/или отбора семян, растений или частей растения, или ДНК из таких семян, растений или частей растения, содержащих в своем геноме мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок.

Этот способ включает скрининг на уровне ДНК, РНК (или кДНК) или белка с использованием известных методов обнаружения присутствия мутантного аллеля. Существует много методов обнаружения мутантного аллеля гена.

Например, если между диким типом и мутантным аллелем существует разница в один нуклеотид (однонуклеотидный полиморфизм, SNP), для определения того, содержит ли растение или часть растения, или клетка растения нуклеотид дикого типа или мутантный нуклеотид в своем геноме, можно использовать SNP-генотипирование. Например, SNP может с легкостью идентифицироваться путем KASP-анализа (аллель-специфическая ПНП, см. [kpbioscience.co.uk](http://kpbioscience.co.uk)) или других методов SNP-генотипирования. Для KASP-анализа можно выбрать, например, 70 предшествующих пар оснований и 70 последующих пар оснований вниз от SNP, и могут быть сконструированы два аллель-специфических прямых праймера и один аллель-специфический обратный праймер. См., например, Allen et al. 2011, *Plant Biotechnology J.* 9, 1086-1099, в частности, KASP-анализ описан на стр. 097-1098.

Также можно использовать другие анализы генотипирования. Например, также может использоваться анализ генотипирования TaqMan SNP, высокоразрешающее плавление (HRM), чипы SNP-генотипирования (например, Fluidigm, Illumina и т.д.) или секвенирование ДНК.

С помощью генотипирования диплоидных растений или частей растения (клетки, листья, ДНК и т.д.) можно определять генотипы SNP, например, растения или части, содержащие CC для нуклеотида 1687 SEQ ID NO: 1 (гомозиготные по нуклеотиду дикого типа), можно отличить от растений или частей, содержащих CT для 1687 SEQ ID NO: 1 (гетерозиготные по мутантному нуклеотиду) в геноме. Генотипирование тетраплоидных растений или частей растения (клетки, листья, ДНК и т.д.) осуществляется аналогично генотипированию диплоидных растений, с использованием, например, KASP-анализа для определения генотипов SNP, например растения или части, содержащие CCCC для нуклеотида 1687 SEQ ID NO: 1 (гомозиготные по нуклеотиду дикого типа), можно отличить от растений или частей, содержащих другие генотипы для SNP, например CCCA, CCAA и т.д. в геноме. То же самое относится к триплоидным растениям. То же самое также относится к другим полиплоидам.

В соответствии с предпочтительным аспектом вышеуказанные способы, растения, клетки растений и части растений, которые содержат по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, относятся к растениям арбуза, в частности, к культурным растениям арбуза, например, к культурным диплоидным, тетраплоидным или триплоидным растениям арбуза.

Такие растения арбуза могут представлять собой линии скрещивания или сорта. Мутантный аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, может быть создан или введен (например, из семян с номером доступа NCIMB42532 или из их потомства) в любом культурном растении арбуза для получения линий или разновидностей, содержащих мутантный аллель SDS-подобного белка, предпочтительно в

гомозиготной форме. Культурные арбузы дают плоды разных размеров (например, малого размера, в соответствии с описанием в WO 2012069539, например менее 0,9 кг или 0,65 кг и менее; с индивидуальным размером около 3-7 фунтов, т.е. приблизительно 1,4-3,2 кг; с размером для хранения в холодильнике приблизительно 6-12 фунтов, т.е. приблизительно 2,7-5,5 кг, и более крупных размеров до 35 фунтов (т.е. приблизительно 15,9 кг), с различным цветом мякоти, с различными формами плодов и с различным цветом кожуры. Таким образом, мутантный аллель может быть введен в культурное растение арбуза, в результате чего путем скрещивания получают плоды любой формы (например, удлиненные, овальные, овально-удлиненные, тупоконечные, тупоконечно-удлиненные, сферические или круглые), с любой поверхностью плода (например, бороздчатые, гладкие), цветом мякоти (например, красный, темно-красный, алый, кораллово-красный, оранжевый, оранжево-желтый или розовый, желтый, канареечно-желтый или белый), цветом кожуры (например, светло-зеленый; темно-зеленый; зеленовато-полосатый с узкими, средними или широкими полосами; серый тип; с пятнами или без; золотисто-желтый; с кожурой типа сорта *Crimson*, с кожурой типа сорта *Jubilee*; с кожурой типа сорта *Allsweet*; черный/темно-зеленый), толщиной кожуры, прочностью кожуры, рисунком кожуры (например, полосатый, без полосок, сетчатый), структурой мякоти/твердостью, содержанием ликопинов и/или витаминов, с различным отношением сахара и кислоты, с превосходным вкусом плодов и т.д. См. Guner and Wehner 2004, *Hort Science* 39(6): 1175-1182, в частности, стр. 1180-1181, где приведено описание генов и характеристик плодов, придаваемых этими генами.

Общими основными целями селекции являются ранняя зрелость, высокий урожай плодов, высокое внутреннее качество плодов (хороший однородный цвет, высокое содержание сахара, правильное соотношение сахара и кислоты, хороший вкус, высокое содержание витаминов и ликопина, плотная текстура мякоти, неволокнистая текстура мякоти, отсутствие дефектов, таких как пустотелость, некроз кожуры, вершинная гниль или крестообразное растрескивание, хорошие характеристики кожуры и устойчивость к растрескиванию). Плоды растений такой линии или сорта предпочтительно являются плодами, пригодными для продажи. В соответствии с одним аспектом среднее содержание сухих веществ составляет по меньшей мере 6,0, 7,0, 8,0 или по меньшей мере 9,0, предпочтительно по меньшей мере 10,0, более предпочтительно по меньшей мере 11,0 или более.

Плоды могут быть любого цвета, например красного, темно-красного, алого, кораллово-красного, оранжевый, оранжево-желтого, розового, розовато-красного, желтого, канареечно-желтого или белого. Предпочтительно плоды имеют мякоть однородного цвета.

Информация о внесении в базу данных.

Семена диплоидных растений *Citrullus lanatus*, отобранных по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, были депонированы компанией Nunhems B.V. в соответствии с Будапештским договором под номером доступа № NCIMB 42532 в NCIMB Ltd., Баксберн, Абердин, AB21 9YA, Шотландия, 27.01.2016 г. Для внесения в базу данных семян аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, был обозначен как *emb1*. Применяется экспертное решение.

Депонированные семена были получены в результате самоопыления и обратного скрещивания растения, гомозиготного по мутантному аллелю *emb1*, с растениями, гомозиготными по аллелю дикого типа *emb1*. Таким образом, 25% депонированных семян являются гомозиготными по мутантному аллелю *emb1* и дают бесплодные плоды, 50% являются гетерозиготными по мутантному аллелю и 25% гомозиготны по аллелю дикого типа, кодирующему циклин-SDS-подобный белок дикого типа.

В течение периода рассмотрения настоящей заявки доступ к внесенным в базу данных образцам будет предоставляться лицами, определяемым Руководителем ведомства США по патентам и торговым маркам, по запросу.

С учетом положений Раздела 37 Свода Федеральных Правил США, § 1.808(b), любые ограничения, накладываемые вносящим лицом в отношении общедоступности внесенного в базу данных материала, после предоставления патента в безотзывном порядке снимаются путем предоставления доступа к внесенному в базу данных материалу. Внесенный в базу данных материал сохраняется в течение 30 лет или в течение 5 лет со дня последнего запроса или в течение срока действия патента, в зависимости от того, какой из указанных сроков заканчивается позже; если в течение этого периода вирус станет нежизнеспособным, материал подлежит замене. Заявитель не отказывается от каких-либо прав, предоставляемых в соответствии с этим патентом по настоящей заявке или в соответствии с Законом о защите прав селекционеров (Раздел 7 Свода законов США 2321, и далее).

### Описание последовательностей

- SEQ ID NO: 1: Геномная последовательность гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, дикого типа из *Citrullus lanatus*.
- SEQ ID NO: 2: Аминокислотная последовательность SDS-подобного белка из *Citrullus lanatus*. Эта аминокислотная последовательность может быть получена из кодирующей последовательности SEQ ID NO: 1.
- SEQ ID NO: 3: Последовательность мРНК мутантного аллеля циклин-SDS-подобного белка из *Citrullus lanatus*.
- SEQ ID NO: 4: Аминокислотная последовательность мутантного аллеля SDS-подобного белка. Эта аминокислотная последовательность может быть получена из последовательности SEQ ID NO: 3.
- SEQ ID NO: 5: Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, дикого типа из *Cucumis melo*.
- SEQ ID NO: 6: Аминокислотная последовательность SDS-подобного белка из *Cucumis melo*. Эта аминокислотная последовательность может быть получена из кодирующей последовательности SEQ ID NO: 5.
- SEQ ID NO: 7: Искусственная последовательность, используемая в качестве праймера (A4532) в ПЦР и/или для секвенирующих реакций.
- SEQ ID NO: 8: Искусственная последовательность, используемая в качестве праймера (A4533) в ПЦР и/или для секвенирующих реакций.
- SEQ ID NO: 9: Искусственная последовательность, используемая в качестве праймера (A4534) в ПЦР и/или для секвенирующих реакций.
- SEQ ID NO: 10: Искусственная последовательность, используемая в качестве праймера (A4535) в ПЦР и/или для секвенирующих реакций.
- SEQ ID NO: 11: Искусственная последовательность, используемая в качестве праймера (A4538) в ПЦР и/или для секвенирующих реакций.
- SEQ ID NO: 12: Аминокислотная последовательность SDS-подобного белка из *Cucumis sativus*.
- SEQ ID NO: 13: последовательность образца 114 и 115 Фигуры 2
- SEQ ID NO: 14: последовательность образца 114 и 115 Фигуры 2
- SEQ ID NO: 15: последовательность образца 116 и 117 Фигуры 2
- SEQ ID NO: 16: последовательность образца 116 и 117 Фигуры 2
- SEQ ID NO: 17: Последовательность кДНК мутантного циклин-SDS-подобного гена арбуза, содержащего мутацию С-Т в нуклеотиде 670, в результате которой получают стоп-кодон в нуклеотидах 670 – 671
- SEQ ID NO: 18: Мутантного циклин-SDS-подобный белок арбуза, кодированный кДНК SEQ ID NO: 17
- SEQ ID NO: 19: Аминокислотная последовательность SDS-подобного белка дикого типа из *Solanum lycopersicum*

SEQ ID NO: 20: Аминокислотная последовательность SDS-подобного белка дикого

типа из *Capsicum annuum***Описание фигур**

Фиг. 1 - плоды арбуза из растений дикого типа (1A), растения дикого типа по сравнению с плодами растений-мутантов EMB1 (1B), срез бессемянных плодов мутантного растения EMB1 (1C) и вскрытые семена без зародышей мутантного растения EMB1 (1D);

фиг. 2 - выравнивание последовательностей для сравнения последовательностей, полученных для образцов № 114, 115, 116 и 117. Номер в верхней правой части указывает положение нуклеотида в соответствующей последовательности, представленной под SEQ NO 1. Образцы № 116 и 117 получены из мутантных растений EMB1. Образцы № 114 и 115 получены из растений дикого типа;

фиг. 3 - электрофоретический анализ продуктов ПЦР, полученных из кДНК образцов № 114, 115, 116 и 117 на полиакриламидном геле. Образцы № 114 и 115 получены из растений дикого типа. Образцы № 116 и 117 получены из мутантных растений EMB1.

**Общие методы****1. Выделение РНК.**

Молодую ткань семязачатка разрезали на мелкие кусочки, заморозили в жидком азоте и хранили при -80°C до дальнейшего использования. Замороженные кусочки ткани измельчали в порошок с помощью ступки и пестика в жидком азоте, чтобы порошок оставался замороженным. 100 мг порошка использовали для выделения тотальной РНК с использованием набора для выделения растительной РНК в соответствии с протоколом производителя (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen).

**2. Получение кДНК.**

РНК обрабатывали ДНКазой (без TURBODNA, Ambion) и 0,9 мкг РНК использовали для обратной транскрипции в соответствии с протоколами производителя (iScript cDNA Synthesis kit, BioRad).

**3. ПЦР на кДНК.**

ПЦР проводили в общем объеме 20 мкл буфера (реакционный буфер Phire, Thermo Fisher Scientific), содержащего 0,2 мМ дНТФ, 0,4 мкл ДНК-полимеразы Phire Hot Start II (Thermo Fisher Scientific), 0,25 мкМ каждого праймера и 0,4 мкл смеси кДНК. После начального этапа денатурирования в течение 30 мин при 90°C, проводили 40 циклов по 10 с при 98°C, 15 с при 60°C и 30 с при 72°C, затем реакцию завершали в течение 3 мин. при 72°C.

**4. Секвенирование.**

Размер продукта ПЦР анализировали с использованием системы QIAxcel Advanced System (Qiagen) и реакционную смесь ПЦР направляли соответствующему поставщику услуг для секвенирования (BaseClear, NL).

**Примеры****1. Выделение мутантов с бессемянными плодами.**

Мутантную популяцию определяли путем обработки в течение нескольких часов приблизительно 10000 семян арбуза из инбредной линии (WMZD0048TYY, далее сокращенно - TYY) с использованием ЭМС и последующей промывки семян в проточной водопроводной воде в течение 30 мин. После этого семена оставляли влажными до посева в почву. Из мутагенизированных семян выращивали растения M1, затем осуществлялось их самоопыление и сбор семян (поколение M2). По восемь семян из каждого семейства из 3000 семейств M2 высевали и выделяли растения-мутанты, дающие бессемянные плоды. Одно из этих мутантных растений было обозначено как EMB1. Размножение растения-мутанта EMB1 осуществлялось путем прививки черенков растения-мутанта EMB1 к подвою немутагенизированного растения арбуза.

**2. Подтверждение фенотипа с бессемянными плодами.**

Мутант EMB1 подвергали обратному скрещиванию с исходной, немутагенизированной инбредной линией арбуза TYY с использованием пыльцы мутанта EMB1 (поколение BC1). 25% растений, выращенных из поколения BC1, полученного в результате самоопыления, давали бессемянные плоды.

Также, для создания картирующей популяции использовали пыльцу мутанта EMB1 для скрещивания с различными инбредными линиями арбуза. После самоопыления 25% растений картирующей популяции давали бессемянные плоды.

Результаты соответствующих обратных скрещиваний и скрещиваний, в которых для оплодотворения других инбредных линий использовалась пыльца мутанта EMB1, ясно демонстрируют, что пыльца мутанта EMB1 является фертильной.

В дальнейших скрещиваниях в качестве родительских женских особей использовались мутантные растения EMB1, гомозиготные по мутантному аллелю *emb1*, которые опылялись пыльцой из других линий. 100% растений, полученных в результате каждого из этих скрещиваний, давали бессемянные плоды.

Результаты различных скрещиваний демонстрируют, что мутация *emb1* обусловлена одним рецессивным аллелем. Результаты также показывают, что фенотип бессемянных плодов сохраняется, когда для опыления растений-мутантов EMB1 используется пыльца растений с семенами. Таким образом, фенотип бессемянных плодов не является следствием аберрантной пыльцы мутанта EMB1, но может быть

отнесен к дефектам в развитии зародыша.

### 3. Идентификация гена, вызывающего фенотип бессемянного плода.

Был проведен анализ картирующей популяции, установленной путем опыления различных инбредных линий арбуза пыльцой из растения-мутанта EMB1, и в геномной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1, был обнаружен однонуклеотидный полиморфизм (SNP) В SEQ ID NO: 1 представлена последовательность аллеля дикого типа. В соответствующем аллеле растения-мутанта EMB1 гуанин (G) в положении 2185 в SEQ ID NO: 1 заменен аденином (A).

### 4. Анализ мРНК, транскрибированной с аллелями emb1.

С полевых растений были собраны цветочные почки разных размеров. Образцы № 114 и 115 - это цветочные почки растений исходной инбредной линии, обозначенной ТУУ, которая использовалась для мутагенеза. Таким образом, ТУУ представляет растения дикого типа, содержащие аллели emb1 дикого типа. Образцы № 115 и 116 - цветочные почки мутантных растений EMB1, дающих бессемянные плоды, которые содержат мутантные аллели emb1. Обзор фенотипов, собранного и проанализированного материала с соответствующими номерами образцов приведен в табл. 1.

Таблица 1

| Номер образца | Наименование образца растения | Собранная ткань           | Фенотип                      |
|---------------|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 114           | ТУУ (101)                     | Цветочная почка, 1 мм     | Плод с семенами, дикого типа |
| 115           | ТУУ (102)                     | Цветочная почка, 3 - 4 мм | Плод с семенами, дикого типа |
| 116           | EMB1 (103)                    | Цветочная почка, 1 мм     | Бессемянный плод             |
| 117           | EMB1 (104)                    | Цветочная почка, 3 - 4 мм | Бессемянный плод             |

РНК выделяли из цветочных почек с разными номерами образцов. 700 нг РНК для каждого из номеров образцов использовали для синтеза кДНК. Для каждого из полученных образцов кДНК проводилась реакция ПЦР с использованием праймеров A4532 (SEQ ID NO: 7) и A4533 (SEQ ID NO: 8). Праймеры были сконструированы для амплификации части аллеля emb1 кодирующей последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. Проводился анализ продуктов ПЦР на полиакриламидном геле, результаты которого приведены на фиг. 3. Из фиг. 3 очевидно, что из образцов № 116 и 117 был получен более короткий фрагмент ПЦР по сравнению с всеми другими номерами образцов. Это ясно указывает на то, что мРНК мутантного аллеля emb1 содержит делецию нуклеотидов по сравнению с соответствующим аллелем дикого типа в образцах № 114 и 115.

### 5. Анализ кДНК последовательности аллелей emb1.

Производилось секвенирование кДНК образцов № 114, 115, 116 и 117 с использованием праймера A4532, представленного под SEQ ID NO: 7, праймера A4538, представленного под SEQ ID NO: 11, праймера A4534 SEQ ID NO: 9 и праймера A4535 SEQ ID NO: 10. Последовательности, полученные из каждого из образцов № 116 и 117, представлены под SEQ ID NO: 3 как молекула мРНК. Последовательности, полученные из каждого из образцов № 114 и 115, идентичны кодирующей последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1. Сравнение последовательностей, полученных из образцов № 114, 115, 116 и 117, показало, что последовательности каждого из образцов № 116 и 117 имеют делецию из 16 последовательных нуклеотидов по сравнению с последовательностями каждого из образцов № 114 и 115. Кроме того, последовательности каждого из образцов № 116 и 117 имеют сдвиг рамки, который приводит к преждевременному стоп-кодону в кодирующей последовательности по сравнению с последовательностями каждого из образцов № 114 и 115. Выравнивание соответствующих частей последовательности показано на фиг. 2.

Можно сделать вывод, что мутантный аллель emb1 образцов № 116 и 117 транскрибируется в мРНК, которая имеет делецию, сдвиг рамки в рамке считывания и преждевременный стоп-кодон по сравнению с мРНК, транскрибированной с аллеля дикого типа образцов № 114 и 115. Кроме того, из фиг. 2 видно, что мРНК, транскрибированная с мутантного аллеля emb1 образцов № 116 и 117, кодирует белок, в котором имеется замена 8 аминокислот по сравнению с белком, кодируемым мРНК, транскрибированной с аллеля дикого типа образцов № 114 и 115.

### 6. Поколение другого мутантного растения арбуза.

Зная последовательность циклин-SDS-подобного гена, можно создать другие мутантные аллели в SDS-подобном гене. TILLING-популяцию, мутагенизированную с помощью ЭМС, подвергли скринингу с помощью праймеров, сконструированных на основании домена, в котором с помощью ЭМС-мутации кодон, кодирующий аминокислоту, преобразовывается в стоп-кодон.

Прямой праймер: CGAAGAGAAAGGATTAGACGTTG (SEQ ID NO: 21).

Обратный праймер: TCTGAGCAGTCAGTATCAGACG (SEQ ID NO: 22).

Осуществляли идентификацию растения, содержащего мутантный циклин SDS-подобный аллель. Идентифицированный аллель содержит одну нуклеотидную замену в нуклеотиде 1687 SEQ ID NO: 1, в результате чего получают стоп-кодон. Таким образом, мутантный аллель кодирует усеченный циклин-SDS-подобный белок, содержащий лишь аминокислоты 1-223 белка дикого типа SEQ ID NO: 2. кДНК мутантного аллеля представлена в SEQ ID NO: 17, а усеченный белок, кодируемый мутантным аллелем, представлен в SEQ ID NO: 18.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение арбуза для получения растения, дающего бессемянные плоды, отличающееся тем, что растение содержит мутантный аллель гена, кодирующий циклин-SDS-подобный белок, причем аллель дикого типа кодирует белок дикого типа, имеющий по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 2 и указанный мутантный аллель кодирует мутантный циклин-SDS-подобный белок, включающий замену, вставку или удаление одной или нескольких аминокислот в консервативном домене Cyclin\_N, кодированном нуклеотидами 2276-3248 последовательности SEQ ID NO: 1, и/или в консервативном домене Cyclin\_C, кодированном нуклеотидами 3255-4511 последовательности SEQ ID NO: 1, обеспечивая указанное растение, дающее бессемянные плоды при опылении, когда мутантный аллель присутствует в гомозиготной форме.

2. Растение арбуза по п.1, отличающееся тем, что указанный мутантный циклин-SDS-подобный белок не имеет домен Cyclin\_N, кодированный нуклеотидами 2276-3248 последовательности SEQ ID NO: 1, и/или не имеет консервативный домен Cyclin\_C, кодированный нуклеотидами 3255-4511 последовательности SEQ ID NO: 1.

3. Растение арбуза по п.1 или 2, отличающееся тем, что мутантный аллель кодирует мутантный усеченный белок, который включает только аминокислоты 1-357 белка последовательности SEQ ID NO: 2 или который включает только аминокислоты 1-223 белка последовательности SEQ ID NO: 2.

4. Растение арбуза по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что мутантный аллель кодирует белок последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 18.

5. Способ получения растения арбуза, включающий следующие этапы:

а) идентификацию растения, которое имеет мутацию в аллеле, кодирующем ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок, при этом аллель дикого типа гена кодирует циклин-SDS-подобный белок, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO 2, и

б) определение того, является ли растение арбуза растением с мужской фертильностью, и дает ли растение арбуза или потомство растения, полученное путем самоопыления, бессемянные плоды, и

с) отбор растения, содержащего по меньшей мере одну копию мутантного аллеля в соответствии с этапом а), причем мутантный аллель гена, кодирующего мутантный циклин-SDS-подобный белок из этапа а), кодирует мутантный циклин-SDS-подобный белок, включающий замену, вставку или удаление одной или нескольких аминокислот в консервативном домене Cyclin\_N, кодированном нуклеотидами 2276-3248 последовательности SEQ ID NO: 1, и/или в консервативном домене Cyclin\_C, кодированном нуклеотидами 3255-4511 последовательности SEQ ID NO: 1, обеспечивая, что указанное растение дает бессемянные плоды при опылении, когда мутантный аллель присутствует в гомозиготной форме.

6. Способ получения растения арбуза, включающий следующие этапы:

а) введение мутаций в популяцию растений арбуза;

б) отбор растения арбуза с мужской фертильностью, дающего бессемянные плоды;

с) проверка того, имеет ли растение, отобранное на этапе б), мутацию в аллеле, кодирующем ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок, и отбор растения, содержащего такую мутацию, и

д) выращивание/культивирование растений, полученных на этапе с), при этом аллель дикого типа гена кодирует циклин-SDS-подобный белок, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности SEQ ID NO 2, и причем мутантный аллель гена, кодирующего мутантный циклин-SDS-подобный белок, отобранный на этапе с), кодирует мутантный циклин-SDS-подобный белок, включающий замену, вставку или удаление одной или нескольких аминокислот в консервативном домене Cyclin\_N, кодированном нуклеотидами 2276-3248 последовательности SEQ ID NO: 1, и/или в консервативном домене Cyclin\_C, кодированном нуклеотидами 3255-4511 последовательности SEQ ID NO: 1, обеспечивая, что указанное растение дает бессемянные плоды при опылении, когда мутантный аллель присутствует в гомозиготной форме.

7. Растение, дающее бессемянные плоды, полученное способом по п.5 или 6.

8. Часть растения арбуза по любому из пп.1-4 или часть растения арбуза по п.7, отличающаяся тем, что указанная часть содержит клетки с мутацией в аллеле, кодирующем ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок.

9. Семя, содержащее клетки растений по любому из пп.1-4 или 7, отличающееся тем, что указанное семя содержит клетки с мутацией в аллеле, кодирующем ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок.

10. Плод, получаемый из растения по любому из пп.1-4 или 7, или плод, получаемый из растения, полученного из семени по п.9.

11. Растение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанное растение является гомозиготным по мутантному аллелю гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок.

12. Способ получения бессемянного плода, включающий выращивание растения по п.11, и обеспечение опыления указанного растения и сбор урожая бессемянного плода.

13. Сеянец, содержащий клетки растений по любому из пп.1-4 или 7, отличающийся тем, что указанный сеянец содержит клетки с мутацией в аллеле, кодирующем ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок.

14. Черенок, содержащий клетки растений по любому из пп.1-4 или 7, отличающийся тем, что указанный черенок содержит клетки с мутацией в аллеле, кодирующем ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок.

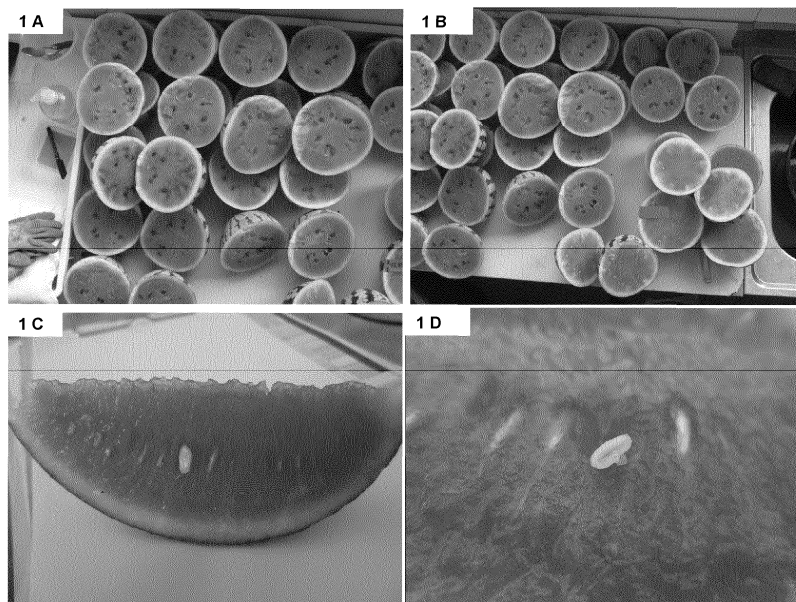
15. Культура ткани *in vitro*, содержащая клетки растений по любому из пп.1-4 или 7, отличающийся тем, что указанная культура ткани *in vitro* содержит клетки с мутацией в аллеле, кодирующем ген, кодирующий циклин-SDS-подобный белок.

16. Семя арбуза для получения растения, дающего бессемянные плоды, отличающееся тем, что семя содержит мутантный аллель гена, кодирующий циклин-SDS-подобный белок, причем аллель дикого типа кодирует белок дикого типа, имеющий по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 2, и указанный мутантный аллель кодирует мутантный циклин-SDS-подобный белок, включающий замену, вставку или удаление одной или нескольких аминокислот в консервативном домене Cyclin\_N, кодированном нуклеотидами 2276-3248 последовательности SEQ ID NO: 1, и/или в консервативном домене Cyclin\_C, кодированном нуклеотидами 3255-4511 последовательности SEQ ID NO: 1, обеспечивая указанное семя для получения растения, дающего бессемянные плоды, при опылении, когда мутантный аллель присутствует в гомозиготной форме.

17. Семя арбуза по п.16, отличающееся тем, что указанный мутантный циклин-SDS-подобный белок не имеет домен Cyclin\_N, кодированный нуклеотидами 2276-3248 последовательности SEQ ID NO: 1, и/или не имеет консервативный домен Cyclin\_C, кодированный нуклеотидами 3255-4511 последовательности SEQ ID NO: 1.

18. Семя арбуза по п.16 или 17, отличающееся тем, что мутантный аллель кодирует мутантный усеченный белок, который включает только аминокислоты 1-357 белка последовательности SEQ ID NO: 2 или который включает только аминокислоты 1-223 белка последовательности SEQ ID NO: 2.

19. Семя арбуза по любому из пп.16-18, отличающееся тем, что мутантный аллель кодирует белок последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 18.

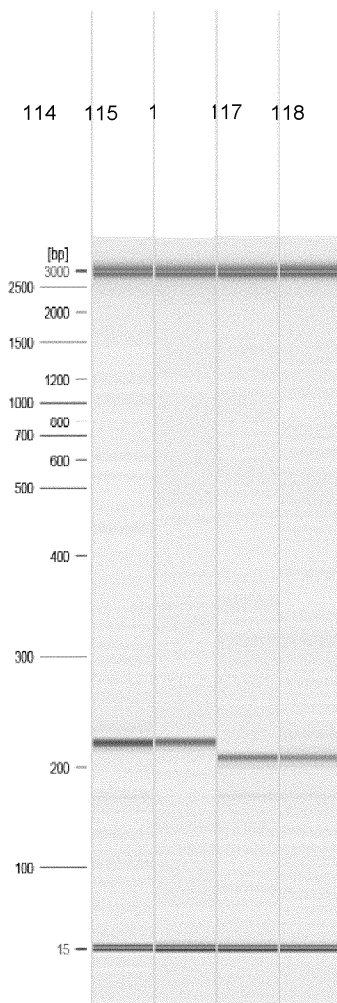


Фиг. 1

2232

|               |             |            |             |            |     |
|---------------|-------------|------------|-------------|------------|-----|
| ACGATTTTGA    | GATTTGAAGA  | ATTGGACGAT | GAAGAAGCCT  | ATCTAATGTT | 114 |
| T I L R F E E | L D D E E A | Y L M F    |             |            |     |
| ACGATTTTGA    | GATTTGAAGA  | ATTGGACGAT | GAAGAAGCCT  | ATCTAATGTT | 115 |
| T I L R F E E | L D D E E A | Y L M F    |             |            |     |
| ACG-----      | -----A      | ATTGGACGAT | GAAGAAGCCT  | ATCTAATGTT | 116 |
| T             |             | N W T M    | K K P I * C |            |     |
| ACG-----      | -----A      | ATTGGACGAT | GAAGAAGCCT  | ATCTAATGTT | 117 |
| T             |             | N W T M    | K K P I * C |            |     |

Фиг. 2



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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