

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202293142** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.03.09**

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

(22) Дата подачи заявки  
**2021.05.07**

---

(54) **РАСТЕНИЯ ТОМАТА С ПОНИЖЕННОЙ РЕКОМБИНАЦИЕЙ В МЕЙОЗЕ**

---

(31) **20174476.0**

(32) **2020.05.13**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/062115**

(87) **WO 2021/228699 2021.11.18**

(71) Заявитель:  
**НУНХЕМС Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:

**Вризен Вим, Схаутен Хендрик Якоб  
(NL)**

(74) Представитель:

**Беляева Е.Н. (BY)**

(57) Изобретение относится к растению томата, содержащему в своем геноме по меньшей мере одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена мужской стерильности 10 (MS10) дикого типа и мутантный аллель гена отсутствия антоциана (AA) дикого типа, причем в указанном растении частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена MS10 дикого типа и указанным мутантным аллелем гена AA дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном MS10 и геном AA в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа. Настоящее изобретение также относится к семеню, из которого может быть выращено растение по настоящему изобретению, и к части растения по настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу выявления и/или выбора растения с мужской стерильностью, при этом указанный способ включает выращивание растения согласно настоящему изобретению и определение того, отсутствует ли антоциан в гипокотылях указанного растения. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу выявления и/или выбора растения или части растения согласно настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу производства растения томата или части растения томата с мужской стерильностью и гипокотылями с отсутствием антоцианина, причем в указанном растении или части растения частота рекомбинаций в мейозе между свойством мужской стерильности и свойством гипокотилей с отсутствием антоцианина снижается по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном MS10 и геном AA в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа.

**A1**

**202293142**

**202293142**

**A1**

## Растения томата с пониженной рекомбинацией в мейозе

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[1] Настоящее изобретение относится к области разведения растений. Предоставляется растение *Solanum lycopersicum*, содержащее в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена мужской стерильности 10 (*MS10*) дикого типа и мутантный аллель гена отсутствия антоциана (*AA*) дикого типа, причем в указанном растении частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа. Настоящее изобретение также относится к семеню, из которого может быть выращено растение по настоящему изобретению, и к части растения по настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу выявления и/или выбора растения с мужской стерильностью, при этом указанный способ включает выращивание растения согласно настоящему изобретению и определение того, отсутствует ли антоциан в гипокотылях указанного растения. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу выявления и/или выбора растения или части растения согласно настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу производства растения томата или части растения томата с мужской стерильностью и гипокотылями с отсутствием антоциана, причем в указанном растении или части растения частота рекомбинаций в мейозе между свойством мужской стерильности и свойством гипокотылей с отсутствием антоциана снижается по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа.

### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[2] При промышленном производстве томатов выращивают преимущественно гибридные сорта F1 *Solanum lycopersicum*, поскольку данные сорта обеспечивают высокую урожайность в сочетании с другими улучшенными характеристиками качества, такими как строение растения, устойчивость к болезням и качество

плодов. Для получения гибридных семян томатов F1 необходимо, чтобы женский родитель не производил функциональные пыльники, пыльцу или мужские гаметы. Традиционно это достигается путем ручного кастрирование всех цветков женского родителя, что крайне дорого и трудоемко. В качестве альтернативы можно использовать систему мужской стерильности (МС), при которой такое ручное кастрирование цветков не требуется. Кроме того, использование системы МС предотвращает загрязнение гибридных семян случайно самоопыленными цветами.

[3] Известная система МС у *Solanum lycopersicum* основана на единственном рецессивном гене мужской стерильности 10 (*MS10*) и десятилетиями использовалась для производства гибридных семян томатов F1; см. Kumar & Singh (2005) Механизмы выведения гибридов овощей. *Journal of New Seeds* 6, 381–407. Растения *Solanum lycopersicum*, гомозиготные по мутантному аллелю *ms10*, демонстрируют полную мужскую стерильность в сочетании с нормально развитыми пестиками, которые доступны для ручного опыления с получением семян гибрида F1. Согласно имеющемуся описанию, ген *MS10* кодирует основной фактор транскрипции спираль-петля-спираль. Мутации, приводящие к отсутствию экспрессии или достаточно сниженной экспрессии гена *MS10* дикого типа и/или к экспрессии мутантного белка *ms10* с потерей функции или с достаточно ограниченной функцией по сравнению с белком *MS10* дикого типа, обеспечивают появление фенотипа мужской стерильности.

[4] Женские растения *ms10*, необходимые для семян гибрида F1 *Solanum lycopersicum*, получают посредством обратного скрещивания или самоопыления растений, которые являются гетерозиготными по используемому мутантному аллелю *ms10*. Такое обратное скрещивание или самоопыление приводит к получению потомства, которое представляет собой смесь гомозиготных по мутантному аллелю *ms10* растений с мужской стерильностью и растений, не гомозиготных по мутантному аллелю *ms10*, которые непригодны для получения семян гибридов F1. Растения с мужской стерильностью, которые являются гомозиготными по мутантному аллелю *ms10*, можно отличить от остальных растений-потомков за счет отбора с помощью маркеров, который при этом требует много времени и является относительно дорогостоящим.

[5] В качестве альтернативы было описано, что локус гена *MS10* на хромосоме 2 генома *Solanum lycopersicum* относительно близок к локусу гена с отсутствием

антоциана (AA) (Zhang et al. Mol Breeding (2016) 36:107). Сеянцы растений томата, которые являются гомозиготными по мутантному аллелю гена AA, можно визуально отличить от гетерозиготных сеянцев и сеянцев, которые являются гомозиготными по аллелю дикого типа, по зеленой окраске гипокотилия. Впоследствии было высказано предположение о том, что при использовании растений томата, имеющих как мутантный ген AA, так и мутантный ген MS10 на хромосоме 2 гена AA, растения с мужской стерильностью, являющиеся гомозиготными по мутантному аллелю ms10, можно визуально отбирать по цвету гипокотилия. Однако при этом локусы гена MS10 и гена AA на хромосоме 2 отстоят друг от друга примерно на 1,2 млн п.о., что соответствует генетической дистанции примерно в 7 сМ. Это означает, что примерно в 7% производимых гетерозиготным растением гамет мутантный аллель aa больше не связан с мутантным аллелем ms10. Следовательно, невозможно надежно отобрать растения с мужской стерильностью исключительно на основании цвета гипокотилия сеянца, так как это привело бы к отбору родительских растений, которые демонстрируют фенотип гипокотилия без антоцианов, но не имеют мужского стерильного фенотипа. Соответственно отобранные родительские растения, которые демонстрируют фенотип гипокотилия с отсутствием антоцианов, все же должны быть подвергнуты выбору с помощью маркеров, чтобы предотвратить загрязнение семян гибридов из-за случайного самоопыления. Таким образом, существует потребность в системе МС при селекции томатов, которая позволяет более надежно, с экономией времени и расходов, производить отбор растений с мужской стерильностью на основе цвета гипокотилия сеянцев.

### **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[6] Настоящее изобретение относится к растению вида *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена мужской стерильности 10 (*MS10*) дикого типа и мутантный аллель гена отсутствия антоциана (*AA*) дикого типа, причем в указанном растении частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной

последовательности с SEQ ID NO: 1, и мутантный аллель гена *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, и мутантный аллель гена *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа.

[7] Настоящее изобретение также относится к семени, из которого может быть выращено растение по настоящему изобретению, и к части растения по настоящему изобретению, причем указанная часть растения предпочтительно представляет собой лист, пыльник, пестик, стебель, черешок, корень, семяпочку, пыльцу, микроспору, протопласт, каллус, ткань, семя, цветок, семядолю, гипокотиль, зародыш или клетку.

[8] В настоящем документе также представлена часть растения согласно настоящему изобретению, причем указанная часть растения представляет собой лист, пыльник, пестик, стебель, черешок, корень, семяпочку, пыльцу, микроспору, протопласт, каллус, ткань, семя, цветок, семядолю, гипокотиль, зародыш или клетку.

[9] Далее настоящим изобретением предоставляется способ выявления и/или выбора растения с мужской стерильностью, при этом указанный способ включает выращивание растения согласно настоящему изобретению и определение того, отсутствует ли антоциан в гипокотилиях указанного растения.

[10] Далее настоящим изобретением предоставляется способ выявления и/или выбора растения или части растения видов *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена *MS10* дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа, причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, и мутантный аллель гена *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок

с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, и мутантный аллель гена *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем указанный способ включает определение того, снижается ли в растении или части растения частота рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа.

[11] Далее настоящим изобретением предоставляется способ производства растения или части растения видов *Solanum lycopersicum* с мужской стерильностью и гипокотильями с отсутствием антоциана, причем в указанном растении или части растения частота рекомбинаций в мейозе между свойством мужской стерильности и свойством гипокотилей с отсутствием антоциана снижается по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, при этом указанный способ включает: (а) индуцирование в растение или часть растения двухцепочечного разрыва как в ген *MS10*, так и в ген *AA*, причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, и причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3; (б) при необходимости, регенерацию части растения, в которой двухцепочечный разрыв индуцируется в растение или различную часть растения.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР**

[12] Фигура 1: Обзор подхода по Примеру 1. А. Схематическое изображение положения задействованных генов на хромосоме 2 томата. *MS* относится к гену мужской стерильности, а *AA* к гену отсутствия антоцианов. Размеры и положения генов приведены не в масштабе. В. Положения двухцепочечных разрывов, индуцированных CRISPR-Cas, в этих двух генах показаны в виде вспышек света. Небольшая часть вырезанных хромосомных фрагментов восстанавливается в противоположной ориентации, что влечет за собой индуцированную инверсию. Более того, оба гена (*MS* и *AA*) укорачиваются и теряют свою функцию. Это

приводит к мужской стерильности и отсутствию антоцианов. У гибридов генетическая дистанция между *ms* и *aa* снижается примерно до 0 сМ из-за подавления рекомбинаций индуцированной инверсией. С. Праймеры для проверки наличия случаев индуцированной инверсии показаны маленькими стрелками.

[13] Фигура 2: Представление целевой индуцированной инверсии. Использованные конструкторы CRISPR-Cas9 содержали две гРНК на конструктор, такие как *gMS1* и *gAA1*, нацеленные на гены, соответственно, *MS* и *AA*. Когда на обоих участках одной и той же хромосомы был индуцирован двухцепочечный разрыв, на участке между ними могла произойти инверсия фрагмента ДНК. Инверсия приведет к инактивации обоих генов, поскольку часть одного гена обратно сливается с оставшейся частью другого гена. Для однозначного обнаружения событий инверсии использовались хорошо сконструированные ПЦР-праймеры. В этом примере два праймерных сайта на одной цепи ДНК на границах инверсии (*MS-R* и *AA-R*) ориентированы в геноме дикого типа таким образом, который позволяет предотвратить любую амплификацию в ПЦР. При этом после инверсии новые места размещения сайтов связывания праймеров располагаются близко друг к другу и в противоположных направлениях, что делает возможной амплификацию фрагмента ДНК.

[14] Фигура 3: Верхняя часть фигур представляет собой эталонный геном дикого типа. После инверсии последовательность на стороне *gMS* инвертирована и связана со стороной *gAA*, что показано стрелками. Последовательности гРНК, расстояние между которыми в эталонном геноме составляло около 1,1 млн п.о., были связаны друг с другом, как показано последовательностью снизу. Выравнивание в нижней части фигуры показывает, что ДНК была расщеплена в предполагаемом месте размещения сайтов связывания гРНК. Часть последовательности гРНК, выделенная жирным шрифтом, соответствует последовательности с другой стороны инверсии. Анализ последовательности ДНК одного конца индуцированной инверсии после трансфекции конструктором 1. Последовательность Сэнгера является частью продукта ПЦР, полученного с помощью праймеров *MS-R* и *AA-R* и геномной ДНК из протопластов, трансфицированных конструктором 1, содержащим последовательности гРНК *gMS1* и *gAA1*. Последовательность Сэнгера относится к правой стороне инверсии и фланкирующей ДНК с этой стороны.

[15] Фигура 4: Верхняя часть фигур представляет собой эталонный геном дикого типа. После инверсии последовательность на стороне gMS инвертирована и связана со стороной gAA, что показано стрелками. Последовательности гРНК, расстояние между которыми в эталонном геноме составляло около 1,1 млн п.о., были связаны друг с другом, как показано последовательностью снизу. Выравнивание в нижней части фигуры показывает, что ДНК была расщеплена в предполагаемом месте размещения сайтов связывания гРНК. Часть последовательности гРНК, выделенная жирным шрифтом, соответствует последовательности с другой стороны инверсии. Анализ последовательности ДНК одного конца индуцированной инверсии после трансфекции конструктом 3. Последовательность Сэнгера является частью продукта ПЦР, полученного с помощью праймеров MS-F и AA-F и геномной ДНК из протопластов, трансфицированных конструктом 3, содержащим последовательности гРНК gMS3 и gAA3. Последовательность Сэнгера относится к левой стороне инверсии и фланкирующей ДНК с этой стороны.

[16] Фиг. 5: Верхняя часть фигур представляет собой эталонный геном дикого типа. После инверсии последовательность на стороне gMS инвертирована и связана со стороной gAA, что показано стрелками. Последовательности гРНК, расстояние между которыми в эталонном геноме составляло около 1,1 млн п.о., были связаны друг с другом, как показано последовательностью снизу. Выравнивание в нижней части фигуры показывает, что ДНК была расщеплена в предполагаемом месте размещения сайтов связывания гРНК. Часть последовательности гРНК, выделенная жирным шрифтом, соответствует последовательности с другой стороны инверсии. Анализ последовательности ДНК одного конца индуцированной инверсии после трансфекции конструктом 4. Последовательность Сэнгера является частью продукта ПЦР, полученного с помощью праймеров MS-R и AA-R и геномной ДНК из протопластов, трансфицированных конструктом 4, содержащим последовательности гРНК gMS4 и gAA4. Последовательность Сэнгера относится к правой стороне инверсии и фланкирующей ДНК с этой стороны.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### Общие определения

[17] Термин «геном» относится к генетическому материалу организма. Он состоит из ДНК. Геном включает и гены, и некодирующие последовательности ДНК.

[18] Тест на аллелизм – это известный специалистам тест, который может использоваться для определения того, расположены ли в одном и том же локусе два гена, передающие одно и то же свойство.

[19] Термин «генетический детерминант» относится к генетической информации в геноме растения, которая обеспечивает наличие у него определенного свойства. Соответственно, генетический детерминант содержит генетическую информацию (ген или локус или интрогрессия), которая передает определенное свойство. В целом, генетический детерминант может содержать один ген (или один локус количественных признаков (ЛКП)) или несколько генов. В настоящем изобретении генетическая детерминанта признака мужской стерильности 10 содержит один ген. Кроме того, генетическая детерминанта признака отсутствия антоциана включает один ген.

[20] В тексте настоящей заявки слово «свойство» относится к фенотипу растения. Если растение демонстрирует один или оба признака данного изобретения, его геном содержит один или оба мутантных аллеля, вызывающих появление признаков по изобретению, особенно в настоящем изобретении, когда указанный один или оба мутантных аллеля находятся в гомозиготной форме. Очевидно, что при упоминании в тексте растения, содержащего оба признака по изобретению, имеется в виду растение томата, имеющее признак мужской стерильности 10 и признак отсутствия антоциана, согласно описанию далее по тексту настоящего документа.

[21] Генетический детерминант может быть унаследован рецессивным, промежуточным или доминантным образом. Отбор по фенотипическому свойству выполняется проще, когда унаследование происходит промежуточным или доминантным образом, поскольку большая часть потомства, получаемого в результате скрещивания, демонстрирует это свойство. В целом, генетический детерминант также может содержать комбинацию рецессивных и/или промежуточных и/или доминантных генов или ЛКП. В настоящем изобретении

генетическая детерминанта признака мужской стерильности 10 содержит один рецессивный ген. Кроме того, генетическая детерминанта признака отсутствия антоциана включает один рецессивный ген.

[22] Отбор по генетическому детерминанту (например, мутантный аллель *ms10* или мутантный аллель *aa*) может выполняться на основании фенотипа (свойство, которое может отмечаться). Отбор также может выполняться с использованием молекулярных методов генотипирования, таких как один или несколько молекулярных маркеров, генетически привязанных к мутантному аллелю, или предпочтительно с использованием гена или самой аллельной последовательности, например, с применением молекулярных методов, которые способны отличать случаи присутствия мутантного аллеля и аллеля дикого типа или их продуктов (такие как мРНК или белок, кодированный этим аллелем). Применение молекулярных методов генотипирования при скрещивании (таких, как «маркерная селекция», когда используются генетически связанные маркеры, или других методов генотипирования, таких как генотипирование ОНП) для скрининга предусматривает возможность использования менее крупной популяции (по сравнению с фенотипической селекцией) и может выполняться на самом раннем этапе. Еще одним преимуществом методов молекулярного генотипирования является возможность легко проводить различие между гомозиготными растениями или семенами, не имеющими копий гена *MS10* дикого типа (гомозиготные по мутантному аллелю *ms10*) и/или не имеющими копий гена дикого типа *AA* (гомозиготные по мутантному аллелю *aa*), гетерозиготными растениями или семенами, имеющими одну копию дикого типа и одну мутантную копию гена *MS10* (гетерозиготные по мутантному аллелю *ms10*) и/или имеющими одну копию дикого типа и одну мутантную копию гена *AA* (гетерозиготные по мутантному аллелю *aa*) и гомозиготными растениями или семенами, не имеющими копий мутантного гена *MS10* и/или не имеющими копий мутантного гена *AA* по настоящему изобретению, что можно выполнить даже до прорастания семян или на раннем этапе развития растений, например, до того, как разовьются зрелые цветы.

[23] 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 по всем характеристикам. 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.

[24] 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 локусе (мн. локусы) 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).

[25] Термин «локус» (мн. локусы) означает определенное место или места, или участок на хромосоме, где находится, например, ген или генетический маркер. Таким образом, локус (или локусы) мужской стерильности 10 по настоящему изобретению представляет собой место в геноме растения томата, где обнаружен ген *MS10*. Таким образом, локус (или локусы) отсутствия антоциана по настоящему изобретению представляет собой место в геноме растения томата, где обнаружен ген *MS10*.

[26] Термин «ген» означает (геномную) последовательность ДНК, содержащую участок (участок транскрипции), который записан в информационной молекуле РНК (например, мРНК) в клетке, и функционально связанный регуляторный участок (который также в настоящем документе обозначается, как регуляторная последовательность, например, промотор). Таким образом, ген может включать несколько функционально связанных последовательностей, таких, как промотор, 5'-лидерная последовательность, включающая, например, последовательности, участвующие в инициации трансляции, кодирующий (белок) участок (кДНК или геномную ДНК), а также 3'-нетранслируемую последовательность, включающую, например, сайты терминации транскрипции. Таким образом, разные аллели гена представлены его альтернативными формами, которые могут иметь форму, например, различий по одному или нескольким нуклеотидам геномной

последовательности ДНК (например, в промоторной последовательности, в последовательностях экзона, интрона и т.д.), по мРНК и/или аминокислотной последовательности кодированного белка. Ген может быть эндогенным (в исходном виде) или химерным (например, трансген или цис-ген). Под «промотором» генной последовательности понимается участок ДНК, который инициирует транскрипцию конкретного гена. Промоторы расположены рядом с генами, которые они транскрибируют, в той же цепи в точке до места расположения ДНК. Промоторы могут быть длиной приблизительно в 100-1000 пар оснований. В соответствии с одним аспектом изобретения под промотором понимается участок примерно в 1000 или более пар оснований, например, около 1500 или 2000, в точке до места расположения стартового кодона (т.е. АТG) белка, кодированного этим геном.

[27] Термин «трансген» или «химерный ген» относится к генетическому локусу, содержащему последовательность ДНК, такому как рекомбинантный ген, который был введен в геном растения посредством трансформации, такой как трансформация с помощью *Agrobacterium*. Растение, содержащее трансген, стабильно интегрируемый в свой геном, называется «трансгенным растением».

[28] «Экспрессия гена» означает процесс, в котором ДНК участок, функционально связанный с соответствующими регуляторными участками, в частности, промотором, транскрибируется в РНК, которая является биологически активной, то есть, способна быть переведенной в биологически активный белок или пептид (или активный фрагмента пептида), либо быть активной (например, в посттранскрипционном сайленсинге генов или РНК-интерференции). Кодированная последовательность может быть в смысловой ориентации и кодирует желаемый биологически активный белок или пептид, или активный фрагмент пептида.

[29] «Локус количественных признаков» или «ЛКП» – это хромосомный локус, который кодирует один или несколько аллелей, негативно влияющих на экспрессивность непрерывно распределенного (количественного) фенотипа.

[30] «Физическое расстояние» между локусами (например, между генами и/или между молекулярными маркерами и/или между фенотипическими маркерами) на одной и той же хромосоме – это реальное физическое расстояние, выраженное в

основаниях или парах оснований (п.о.), килобазах или тысячах пар оснований (тыс. п.о.) или в мегабазах или миллионах пар оснований (млн п.о.).

[31] «Генетическое расстояние» между локусами (например, между молекулярными маркерами и/или между фенотипическими маркерами) на той же хромосоме измеряется частотой событий кроссинговера или рекомбинантной частотой (РЧ) и указывается в сантиморганах (сМ). Один сМ соответствует рекомбинантной частоте в 1%. Если рекомбинанты отсутствуют, то значение РЧ равно нулю, и локусы либо расположены очень близко друг к другу физически, либо являются идентичными. Чем больше расстояние между двумя локусами, тем выше значение РЧ.

[32] «Аллель дикого типа» (АДТ) относится в настоящем документе к версии гена, кодирующего функциональный белок (дикий тип белка).

[33] Соответственно, термин «аллель *MS10* дикого типа» или «аллель *MS10*» или «аллель дикого типа гена *MS10*» относится к полностью функциональному аллелю гена *MS10*, который обеспечивает нормальное функционирование белка (т.е., нормальную экспрессию белка в сочетании с нормальной ферментативной активностью экспрессированного белка) по сравнению с аллелем *MS10* дикого типа. Согласно имеющемуся описанию, ген *MS10* кодирует основной фактор транскрипции спираль-петля-спираль. Так, одним из примеров аллеля *MS10* дикого типа в растениях, относящихся к виду *Solanum lycopersicum*, является геномная ДНК дикого типа, которая кодирует последовательность кДНК *MS10* дикого типа (мРНК), показанную в SEQ ID NO:2. В белковой последовательности, которая кодируется этой кДНК *MS10* дикого типа, имеется 209 аминокислотных радикалов, и она показана в SEQ ID NO:1, что соответствует эталонной последовательности XM\_026029418.1 Национального центра биотехнологической информации. Аллель *MS10* *Solanum lycopersicum* дикого типа также содержит функциональные варианты геномной ДНК дикого типа, которая кодирует аминокислотные последовательности кДНК *MS10* дикого типа и аминокислотные последовательности, описание которых приводится в настоящем документе. Чтобы определить, является ли какой-то конкретный вариант аллеля *MS10* дикого типа, отдельно описанный в настоящем документе, «функциональным вариантом», можно использовать стандартные методы, включая, помимо прочего, фенотипическое тестирование на нормальное производство жизнеспособной

пыльцы и компьютерное моделирование для прогнозирования изменений в аминокислотах, которые отражаются на функции белка. Например, распространяемая посредством сети Интернет компьютерная программа SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) – это программа, которая прогнозирует, будет ли оказано влияние на функцию белка в случае замены аминокислоты, см. [sift.bii.a-star.edu.sg/](http://sift.bii.a-star.edu.sg/). Функционально важные аминокислоты будут сохраняться в белковом семействе, и поэтому изменения в хорошо сохранных позициях в основном предсказываются, как непереносимые или вредные; также см. документ НГ и Хеникофф (2003) Исследование нуклеиновых кислот 31(13): 3812–3814. Например, если позиция в цепочке семейства белков содержит только аминокислоту изолейцин, то предполагается, что замена на любую другую аминокислоту недопустима, и что изолейцин необходим для функции белка. Следовательно, прогноз будет состоять в том, что замена на любую другую аминокислоту нанесет вред функции белка. Если позиция в цепочке содержит гидрофобные аминокислоты изолейцин, валин и лейцин, то SIFT фактически делает вывод о том, что данная позиция может содержать только аминокислоты с гидрофобным свойством. В этой позиции прогнозируется, что замена на другие гидрофобные аминокислоты будет переносимой, но при этом согласно прогнозу замена на другие радикалы (такие как заряженный или полярный) повлияет на функцию белка. Еще один инструмент, который можно использовать для прогнозирования функции белка – это Provean; см. [provean.jcvi.org/index.php](http://provean.jcvi.org/index.php). Также функциональным вариантом аллеля *MS10* дикого типа может быть ортолог гена *MS10 Solanum lycopersicum*, особенно у дикой родственной формы вида *Solanum lycopersicum*, но при этом указанный вариант должен обеспечивать нормальную функцию белка.

[34] Термин «аллель дикого типа *AA*» или «аллель *AA*» или «аллель дикого типа гена *AA*» относится к полностью функциональному аллелю гена *AA*, который обеспечивает нормальное функционирование белка (т.е., нормальную экспрессию белка в сочетании с нормальной ферментативной активностью экспрессированного белка) по сравнению с аллелем *AA* дикого типа. Ген *AA* кодирует фермент глутатион-S-трансферазу. Так, одним из примеров аллеля *AA* дикого типа в растениях, относящихся к виду *Solanum lycopersicum*, является геномная ДНК дикого типа, которая кодирует последовательность кДНК *AA* дикого типа (мРНК), показанную в SEQ ID NO:2. В белковой последовательности, которая кодируется этой кДНК *AA*

дикого типа, имеется 230 аминокислотных радикалов, и она показана в SEQ ID NO:3, что соответствует эталонной последовательности XM\_004232621.4 Национального центра биотехнологической информации. Аллель *AA Solanum lycopersicum* дикого типа также содержит функциональные варианты геномной ДНК дикого типа, которая кодирует аминокислотные последовательности кДНК *AA* дикого типа и аминокислотные последовательности, описание которых приводится в настоящем документе. Чтобы определить, является ли какой-то конкретный вариант аллеля *AA* дикого типа, отдельно описанный в настоящем документе, «функциональным вариантом», можно использовать стандартные методы, включая, помимо прочего, проверку ферментативной активности, фенотипическое тестирование цвета гипокотыля и компьютерное моделирование для прогнозирования изменений в аминокислотах, которые отражаются на функции белка, согласно более подробному описанию выше по тексту настоящего документа. Также функциональным вариантом аллеля *AA* дикого типа может быть ортолог гена *AA Solanum lycopersicum*, особенно у дикой родственной формы вида *Solanum lycopersicum*, но при этом указанный вариант должен обеспечивать нормальную функцию белка.

[35] Термин «мутантный аллель» по тексту настоящего документа относится к аллелю с одной или несколькими мутациями по сравнению с диким типом аллеля, в результате использования которого получается свойство по настоящему изобретению. Одна или несколько мутаций могут иметь место в кодирующей последовательности (мРНК, кДНК или геномная последовательность) или в связанной некодирующей последовательности и/или регуляторной последовательности, регулирующей уровень экспрессии кодирующей последовательности. Такая мутация(и) (например, вставка, инверсия, делеция и/или замена одного или нескольких нуклеотида(ов)) может привести к сокращению функциональности кодируемого белка в искусственных и/или в естественных условиях (снижение функции), либо к отсутствию такой функциональности в искусственных и/или в естественных условиях (потеря функции), например, в связи с укорочением белка или с наличием аминокислотной последовательности, в которой одна или более аминокислот удалены, вставлены или заменены. Такие изменения могут привести к тому, что белок, имеющий различные 3D-конформации, станет мишенью для различных субклеточных

компарментов, имеющих один или несколько измененных каталитических доменов с изменениями в связывающей активности с нуклеиновыми кислотами или белками и т.д. Предпочтительно мутантный аллель по настоящему изобретению кодирует укороченный белок, имеющий сниженную функцию или утративший функции по сравнению с белком дикого типа. Кроме того, такая мутация(и) (например, вставка, инверсия, делеция и/или замена одного или нескольких нуклеотида(ов)) может привести к тому, что кодируемый белок будет демонстрировать пониженную экспрессию, или экспрессия белка будет отсутствовать.

[36] Соответственно, термин «мутантный аллель *ms10*» или «аллель *ms10*» или «мутантный аллель гена *MS10*» или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа», помимо прочего, относится к аллелю гена *MS10*, содержащему одну или несколько мутаций в кодирующей последовательности, причем в результате такой одной или нескольких мутаций функция продукта кодированного гена ослабляется или исчезает, что приводит к наличию у растений признака мужской стерильности, если мутантный аллель представлен гомозиготной формой. Термин «мужская стерильность» или «признак мужской стерильности» относится к признаку растения, который приводит к неспособности растения производить функциональные пыльники, пыльцу или мужские гаметы. Термин «мутантный аллель *ms10*» также включает нокаутированные и условно нокаутированные аллели *ms10*, а также аллели *ms10*, кодирующие мутантный белок *ms10* с ослабленной или отсутствующей функций. При использовании по тексту настоящего документа, термин «нокаутированный аллель» относится к аллелю, отличающемуся тем, что экспрессия соответствующего гена (дикого типа) в нем больше не может быть обнаружена. «Условно нокаутированный» аллель обладает ослабленной экспрессией соответствующего гена (дикого типа) по сравнению с аллелем дикого типа.

[37] Соответственно, термин «мутантный аллель *aa*» или «аллель *aa*» или «мутантный аллель гена *AA*» или мутантный аллель гена *AA* дикого типа», помимо прочего, относится к аллелю гена *AA*, содержащему одну или несколько мутаций в кодирующей последовательности, причем в результате такой одной или нескольких мутаций функция продукта кодированного гена ослабляется или исчезает, что приводит к наличию у растений признака отсутствия антоциана, если

мутантный аллель представлен гомозиготной формой. Термин «отсутствие антоциана» или «признак отсутствия антоциана» относится к признаку растения, который приводит к отсутствию антоциановой окраски в гипокотилиях указанного растения. Термин «мутантный аллель *aa*» также включает нокаутированные и условно нокаутированные аллели *aa*, а также аллели *aa*, кодирующие мутантный белок *aa* с ослабленной или отсутствующей функцией.

[38] Термин «индуцированный мутантный аллель» при использовании по тексту настоящего документа относится к любому аллелю гена дикого типа, в результате которого появляется свойство по настоящему изобретению, которое обеспечивается за счет вмешательства человека, такого как мутагенез. Предпочтительно, индуцированный мутантный аллель не встречается в растениях из естественной или селекционной популяции.

[39] Термин «природный мутантный аллель» при использовании по тексту настоящего документа относится к любому аллелю гена дикого типа, в результате которого появляется свойство по настоящему изобретению, отличающемуся тем, что мутантный аллель развился без прямого вмешательства человека. Предпочтительно, природный мутантный аллель встречается в растениях из естественной или селекционной популяции.

[40] Термин «растение дикого типа» в настоящем документе относится к растению томата, предпочтительно к растению вида *Solanum lycopersicum*, содержащему две копии аллеля *AA* дикого типа, в результате чего считается, что оно демонстрирует нормальное производство жизнеспособной пыльцы и нормальное окрашивание гипокотилия. Такие растения, например, являются подходящими контрольными группами в фенотипических анализах, особенно если указанные контрольные растения обладают одинаковым генетическим окружением с растениями (например, мутантными растениями), которые подвергаются фенотипическим исследованиям.

[41] В растении томата ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% (96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0%, или 99.3% или более предпочтительно 99.7%) идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:1. Белок, описанный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1 представляет собой белок MS10 дикого типа в *Solanum lycopersicum* и

соответствует референсной последовательности XM\_026029418.1 NCBI. В диких родичах *Solanum lycopersicum* белок MS10 дикого типа соответственно кодируется ортологом гена *MS10* дикого типа в *Solanum lycopersicum*. Предпочтительно, ортолог гена *MS10 Solanum lycopersicum* в диких родичах *Solanum lycopersicum* кодирует белок, имеющий, по меньшей мере, 95% (например, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7%) идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:1.

[42] В растении томата ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% (96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7%) идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:3. Белок, описанный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3 представляет собой белок *AA* дикого типа в *Solanum lycopersicum* и соответствует референсной последовательности XM\_004232621.4 NCBI. В диких родичах of *Solanum lycopersicum* белок *AA* дикого типа соответственно кодируется ортологом гена *AA* дикого типа в *Solanum lycopersicum*. Предпочтительно, ортолог гена *Solanum lycopersicum* в диких родичах *Solanum lycopersicum* кодирует белок, имеющий, по меньшей мере, 95% (например, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7%) идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:3.

[43] Под термином «ортологичный ген» или «ортолог» понимаются гены в разных видах, которые развились посредством событий видообразования. Обычно считается, что ортологи обладают одинаковыми биологическими функциями в разных видах. Соответственно, особенно предпочтительно, чтобы у белка, кодируемого ортологом гена *MS10 Solanum lycopersicum* дикого типа в диких родственных формах вида *Solanum lycopersicum*, была такая же биологическая функция, как и у белка *MS10 Solanum lycopersicum* дикого типа. Кроме того, особенно предпочтительно, чтобы у белка, кодируемого ортологом гена *AA Solanum lycopersicum* дикого типа в диких родственных формах вида *Solanum lycopersicum*, была такая же биологическая функция, как и у белка *AA Solanum lycopersicum* дикого типа. Методы выявления ортологов хорошо известны специалистам, поскольку они выполняют две задачи: разграничение генеалогии генов для исследования сил и механизмов эволюционного процесса и создания групп генов с одинаковыми биологическими функциями (Fang G, *et al* (2010)

Getting Started in Gene Orthology and Functional Analysis. PLoS Comput Biol 6(3): e1000703. doi:10.1371/journal.pcbi.1000703). Например, ортологи конкретного гена или белка можно выявить с использованием выравнивания последовательности или идентичности последовательности в отношении геновой последовательности рассматриваемого белка с последовательностями других видов. Выравнивание и определение идентичности последовательности генов может выполняться с использованием известных специалистам методов, например, путем определения нуклеиновых кислот и белковых последовательностей в существующей нуклеиновой кислоте или базе данных белков (например, GenBank, SwissProt, TrEMBL) и с использованием стандартного программного обеспечения для анализа последовательностей, такого как инструменты поиска сходства последовательностей (BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLAST, FASTA и т.д.). В соответствии с одним аспектом изобретения ортолог белка MS10 *Solanum lycopersicum* в диких родственных формах *Solanum lycopersicum* обладает, по меньшей мере, 95% (например, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 98,3%, 98,7%, 99,0% или 99,3%, или более предпочтительно 99,7%) идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1. В соответствии с одним аспектом изобретения ортолог белка AA *Solanum lycopersicum* в диких родственных формах *Solanum lycopersicum* обладает, по меньшей мере, 95% (например, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 98,3%, 98,7%, 99,0% или 99,3%, или более предпочтительно 99,7%) идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3.

[44] Термин «фрагмент интрогрессии» или «сегмент интрогрессии», или «область интрогрессии» относится к фрагменту хромосомы (части или области хромосомы), который был введен в другое растение такого же или родственного вида посредством скрещивания или традиционных методов разведения, таких как обратное скрещивание, т.е. фрагмент интрогрессии является результатом использования методов селекции, которые обозначаются глаголом «интрогрессировать» (таких как обратное скрещивание). Очевидно, что термин «фрагмент интрогрессии» никогда не включает в себя целую хромосому, а только ее часть. Фрагмент интрогрессии может быть большим, например, размером даже в три четверти или половину хромосомы, но предпочтительно меньше, например, около 15 Мб или менее, например, около 10 Мб или менее, около 9 Мб или менее,

около 8 Мб или менее, около 7 Мб или менее, около 6 Мб или менее, около 5 Мб или менее, около 4 Мб или менее, около 3 Мб или менее, около 2.5 Мб или 2 Мб или менее, около 1 Мб (равно 1,000,000 пар оснований) или менее, или около 0.5 Мб (равно 500,000 пар оснований) или менее, например, около 200,000 п.о. (равно 200 кило пар оснований) или менее, около 100,000 п.о. (100 т.о.) или менее, около 50,000 п.о. (50 т.о.) или менее, около 25,000 п.о. (25 т.о.) или менее.

[45] Термин «изогенное растение» относится к двум генетически идентичным растениям, единственным отличием в которых является мутантный аллель по настоящему изобретению. Для исследования воздействия признака мужской стерильности и/или признака отсутствия антоциана в соответствии с описанием в настоящем документе можно скрестить линию (или разновидность) исследуемых растений с растением, содержащим мутантный аллель, который обеспечивает наличие признака мужской стерильности, и/или мутантный аллель, который обеспечивает наличие признака отсутствия антоциана, и отобрать потомство, экспрессирующее желательный признак. В некоторых случаях может потребоваться скрестить представителей потомства друг с другом несколько раз, чтобы иметь возможность определить генетические детерминанты признака мужской стерильности и/или признака отсутствия антоциана в фенотипе этого растения. Указанное потомство далее можно подвергнуть обратному скрещиванию (по меньшей мере, 2 раза, например, 2, 4 или предпочтительно 5 или 6 раз) с линией (или разновидностью) исследуемых растений, отбирая при этом представителей потомства, обладающих одинаковым фенотипом, как и у линии (разновидности) исследуемых растений, и экспрессирующих генетические детерминанты для получения признака мужской стерильности и/или признака отсутствия антоциана. Влияние мутантного аллеля, обеспечивающего наличие признака мужской стерильности и/или признака отсутствия антоциана, можно сравнить в рамках всей линии (разновидности) исследуемого растения и его изогенной линии, не содержащей генетических детерминантов признака мужской стерильности и/или признака отсутствия антоциана.

[46] Термин «нуклеотидная последовательность» или «молекула нуклеиновой кислоты» или «полинуклеотид» используется взаимозаменяемо и относится к молекуле ДНК или РНК в одно- или двухцепочечной форме, в частности, ДНК, кодирующей белок или фрагмент белка согласно данному изобретению.

«Изолированная нуклеотидная последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая больше не находится в природной среде, откуда она была выделена, например, к последовательности нуклеиновой кислоты в бактериальной клетке-реципиенте или в ядерном или пластидном геноме растения.

[47] Термины «белок», «пептидная последовательность», «аминокислотная последовательность» или полипептид являются взаимозаменяемыми и относятся к молекулам, состоящим из цепочки аминокислот, независимо от конкретного способа действия, размера, 3-мерной структуры и происхождения. Таким образом, «белком» может называться «фрагмент» или «часть» белка. «Изолированный белок» используется для обозначения белка, который уже не находится в своей природной среде, например, в искусственных условиях или в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-реципиенте.

[48] «Активный белок» или «функциональный белок» – это белок, который имеет активность белка, измеримую в искусственных условиях, например, при анализе активности в искусственных и/или в естественных условиях, например, по фенотипу, передаваемому белком. Белок «дикого типа» представляет собой полностью функциональный белок, представленный в растениях дикого типа. «Мутантный белок» – это белок, включающий одну или несколько мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белки, причем мутация приводит к появлению белка (который кодируется мутантными молекулами нуклеиновой кислоты) с измененной активностью, предпочтительно белка с ослабленной активностью, наиболее предпочтительно белка, не демонстрирующего активность.

[49] «Функциональные производные» белка в соответствии с описанием в настоящем документе – это фрагменты, варианты, аналоги или химические производные белка, которые сохраняют, по меньшей мере, часть активности или иммунологической перекрестной реактивности с антителом, специфичным для мутантного белка.

[50] Фрагмент мутантного белка относится к субпопуляции молекулы.

[51] Вариантные пептиды могут быть получены посредством прямого химического синтеза, например, с использованием известных специалистам способов.

[52] Аналог мутантного белка относится к неприродному белку, который в значительной степени аналогичен всему белку или его фрагменту.

[53] «Мутация» в молекуле нуклеиновой кислоты представляет собой изменение одного или нескольких нуклеотидов по сравнению с последовательностью дикого типа, например, путем замены, делеции, инверсии или вставки из одного или нескольких нуклеотидов.

[54] «Мутация» в молекуле аминокислоты, составляющей белок, – это изменение одной или нескольких аминокислот по сравнению с последовательностью дикого типа, например, путем замены, делеции или вставки одной или нескольких аминокислот. После этого такой белок также называют «мутантным белком».

[55] «Точечная мутация» представляет собой замену одного нуклеотида, вставку, или делецию одного нуклеотида.

[56] «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.

[57] «Миссенс-мутация» или «несинонимичная мутация» – это (точечная) мутация в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, в результате которой кодон кодирует другую аминокислоту. Полученный белок может иметь ослабленную функцию или испытать потерю функции.

[58] «Мутация сайта сплайсинга» – это мутация в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, в результате которой 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 ослабленную функцию или испытать потерю функции.

[59] «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 ослабленную функцию или испытать потерю функции.

[60] 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.

[61] В контексте настоящего изобретения под термином «инверсия» понимается мутация, при которой в данной последовательности нуклеиновой кислоты нуклеотидная последовательность фрагмента, по меньшей мере, из 3 или более нуклеотидов повернута обратно по сравнению с нуклеотидной последовательностью дикого типа.

[62] 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 соответствующего белка дикого типа на N-конце или на C-конце белка отсутствует, по меньшей мере, одна аминокислота, при этом при усечении на 3'-конце или C-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 C-конце. 5'-конец определяется кодоном ATG, который используется в качестве старт-кодона при трансляции соответствующей нуклеотидной последовательности дикого типа.

[63] 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.

[64] 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.

[65] 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.

[66] «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. Под «промотором» генной последовательности соответственно понимается участок ДНК, который инициирует транскрипцию конкретного гена. Промоторы расположены рядом с генами, которые они транскрибируют, в той же цепи в точке до места расположения ДНК. Промоторы могут быть длиной приблизительно в 100-1000 пар оснований. В соответствии с одним аспектом изобретения под промотором понимается участок примерно в 2000 или более пар оснований в точке до места расположения стартового кодона (т.е. ATG) белка, кодированного этим геном, предпочтительно промотором является участок примерно в 1500 пар оснований в точке до места расположения стартового кодона, более предпочтительно промотором является участок примерно в 1000 пар оснований в точке до места расположения стартового кодона.

[67] В соответствии с данным документом, термин «функционально связанный» относится к соединению полинуклеотидных элементов в функциональной взаимосвязи. Нуклеиновая кислота «функционально связана», когда она находится в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновых кислот. Например, промотор, или, скорее, регуляторная последовательность

транскрипции, функционально связана с кодирующей последовательностью, если это влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. «Функционально связан» означает, что нуклеотидные последовательности, будучи связанными, как правило, являются смежными.

[68] «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», 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 делеции = 10, штраф на продолжение делеции = 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 могут быть определены, например, с помощью компьютерных программ, таких как EMBOSS (которая доступна по адресу на сайте [ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) по адресу <http://www.ebi.ac.uk> в разделе на странице /Tools/psa/emboss\_needle/). В качестве альтернативы процент сходства или идентичности последовательности может определяться путем поиска в базах данных, таких как FASTA, BLAST и т.д., однако для сравнения идентичности последовательности совпадения должны быть получены и приведены в соответствие попарно. Два белка или два белковых домена, или две нуклеотидные последовательности имеют «существенную идентичность последовательности», если процент идентичности последовательности составляет, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 98,3%, 98,7%, 99,0% или 99,3% или более предпочтительно 99,7% (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). Такие последовательности по тексту настоящего документа также называются «вариантами», например, другие варианты аллелей, обеспечивающие признаком мужской стерильности и/или признаком отсутствия антоциана по настоящему изобретению, и могут быть выявлены белки конкретной нуклеиновой кислоты и аминокислотных последовательностей по настоящему изобретению, которые производят аналогичное воздействие относительно мужской стерильности и/или отсутствия антоциана, как и растения по настоящему изобретению.

[69] При использовании по тексту настоящего документа термин «гибридизация», как правило, используется для обозначения гибридизации нуклеиновых кислот при соответствующих условиях жесткости (жесткие условия гибридизации), которые будут очевидны для специалистов в данной области в зависимости от характера последовательности-зонда и целевых последовательностей. Условия гибридизации и промывки хорошо известны специалистам, и в рамках привычной практики может выполняться корректировка условий в зависимости от необходимой жесткости за счет изменения времени инкубации, температуры и/или ионной силы. Смотрите, например, Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-ое издание, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк, 1989. Выбор условий, которые диктуются длиной последовательностей, проходящих гибридизацию, в частности, длина последовательности-зонда, относительный GC-состав нуклеиновых кислот и количество допустимых несоответствий. Условия низкой жесткости являются предпочтительными, когда необходима частичная гибридизация между цепочками с меньшими степенями комплементарности. Когда нужна идеальная или практически идеальная комплементарность, предпочтительными являются условия высокой жесткости. Для стандартных условий жесткости раствор гибридизации содержит 6X S.S.C., 0,01 M EDTA, 1X раствора Денхардта и 0,5% SOS. Гибридизация выполняется при температуре 68°C на протяжении примерно от 3 до 4 часов для фрагментов клонированной ДНК и на протяжении примерно от 12 до 16 часов для общей эукариотической ДНК. При менее высоких показателях жесткости температура гибридизации снижается до

примерно 42°C ниже температуры плавления ( $T_m$ ) дуплекса. Как известно,  $T_m$  является функцией G-C-состава и длины дуплекса, а также ионной силы раствора.

[70] При использовании по тексту настоящего документа, выражение «гибридизирует» по отношению к молекуле ДНК или РНК означает, что молекула, которая гибридизирует, например, последовательность олигонуклеотидов, полинуклеотидов или любую последовательность нуклеотидов (в смысловой или антисмысловой ориентации), распознается и гибридизируется до последовательности в другой молекуле нуклеиновой кислоты, которая имеет ориентировочно такой же размер и обладает по отношению к ней достаточным сходством последовательности, чтобы при соответствующих условиях запустить гибридизацию. Например, молекула длиной в 100 нуклеотидов из 3'-кодирующего или некодирующего участка гена будет распознаваться и гибридизоваться до участка длиной примерно в 100 нуклеотидов в нуклеотидной последовательности в пределах 3'-кодирующего или некодирующего участка этого гена или любого другого гена растения, если имеется примерно 70% или более сходства между двумя этими последовательностями. Следует понимать, что размер соответствующего участка обеспечит возможность появления некоторых несоответствий в гибридизации, в результате чего соответствующий участок может оказаться меньше или больше, чем молекула, которая гибридизируется до него, например, на 20-30% больше или меньше, предпочтительно не более чем на 12-15% больше или меньше.

[71] При использовании по тексту настоящего документа выражение «последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности» или «последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности» или «последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности нуклеотидной последовательности» означает последовательность, имеющую 95%, например, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 98,3%, 98,7%, 99,0% или 99,3% или более 99,7% идентичности последовательности по сравнению с указанной эталонной последовательностью. Идентичность последовательности может определяться с использованием способов, описанных в настоящем документе.

[72] «Фрагмент» гена или последовательности ДНК относится к субпопуляции молекулы, например, к более короткому полинуклеотиду или олигонуклеотиду. В

соответствии с одним аспектом изобретения фрагмент включает мутацию согласно определению по настоящему изобретению.

[73] «Вариант» гена или ДНК относится к молекуле, существенно схожей со всем геном или с его фрагментом, таким как вариант замены нуклеотида, содержащий один или несколько замененных нуклеотидов, но при этом поддерживающий способность гибридизироваться с конкретным геном или кодировать транскрипт мРНК, который гибридизируется с нативной ДНК. Предпочтительно этот вариант содержит мутантный аллель согласно определению по настоящему изобретению.

[74] При использовании по тексту настоящего документа термин «растение» включает в себя целое растение или любые его части или производные, такие как органы растений (например, собранные или несобранные цветки, листья и т. д.), клетки растений, протопласты растений, культуры клеток или тканей растений, из которых могут быть восстановлены целые растения, восстанавливаемые или невосстанавливаемые клетки растений, растительные каллусы, скопления клеток растений и клетки растений, которые являются неизменными в растениях или частях растений, таких, как эмбрионы, пыльца, семязачатки, завязи, плоды (например, собранные ткани или органы), цветы, листья, семена, клубни, растения, которые были получены путем клонирования, корни, стебли, семядоли, гипокотили, корневые кончики и тому подобное. Кроме того, термин «растение» включает любую стадию развития растения, например, незрелые и зрелые саженцы и т. д. Предпочтительно, часть растения или производное растение содержит ген или локус MS10 и/или ген или локус AA согласно определению в настоящем изобретении.

[75] Термин «растительная линия» или «линия скрещивания» относится к растению и его потомству.

[76] «Сорт растения» представляет собой группу растений в пределах одного ботанического таксона низшего известного класса, которая (независимо от того, выполнены или нет условия для признания права на защиту созданного сорта растения) может быть определена на основе экспрессии характеристик, получаемых из определенного генотипа или комбинации генотипов, которую можно отличить от любой другой группы растений на основании экспрессии, по меньшей мере, одной из этих характеристик, и которая может рассматриваться как

единое целое, потому что при размножении таких растений не происходит каких-либо изменений. Таким образом, термин «сорт растения» не может быть использован для обозначения группы растений, даже если они того же рода, если все они характеризуются наличием 1 локуса или гена (или ряда фенотипических характеристик в связи с одним локусом или геном), но в противном случае могут серьезно отличаться друг от друга, что касается других локусов и генов. «F1, F2 и т.д.» относятся к последовательно связанным поколениям после скрещивания двух родительских растений или родительских линий. Растения, выращенные из семян, полученных путем скрещивания двух растений или линий, называются поколение F1. В результате самоопыления растений F1 получают поколение F2 и т. д. «Гибрид F1» растения (или семя F1 или гибрид) является поколением, полученным от скрещивания двух инбредных родительских линий. «Самоопыление», соответственно, относится к самостоятельному опылению растения, т.е. к объединению гамет из одного и того же растения.

[77] «Обратное скрещивание» относится к способу скрещивания, согласно которому (отдельное) свойство, такое как мужская стерильность и/или отсутствие антоциана, может передаваться от одного генетического окружения (которое также, как правило, известно как «донор», но не обязательно это более низкосортное генетическое окружение) в другое (которое также известно как «рекуррентный родитель»; как правило, но не обязательно это более высокосортное генетическое окружение). Потомство от скрещивания (например, растение F1, полученное путем скрещивания первого растения определенного вида растений, содержащего мутантный аллель по настоящему изобретению, со вторым растением того же вида растений или иного вида растений, которое может быть скрещено с указанным первым видом растений, отличающееся тем что указанный второй вид растений не содержит мутантного аллеля по настоящему изобретению; или растение F2, или растение F3 и т.д., полученное самоопылением растения F1), подвергается «обратному скрещиванию» с родительским растением указанного второго вида растений. После повторного обратного скрещивания свойство донорского генетического окружения, например, мутантный аллель, передающий признак мужской стерильности и/или отсутствия антоциана согласно описанию в настоящем документе, будет включено в рекуррентное генетическое окружение. Термины «с преобразованным геном» или «преобразованное растение», или

«преобразование локуса» в данном контексте относятся к растениям, которые вырабатываются обратным скрещиванием, отличающимся тем, что помимо одного или нескольких генов, передаваемых из родителя-донора, восстанавливаются практически все желательные морфологические и/или физиологические характеристики рекуррентного родителя. Растения, выращенные из семян, полученных путем обратного скрещивания растений F1 со второй родительской линией растений, называются «поколение BC1». Растения из популяции BC1 могут самоопыляться, в результате чего получается поколение BC1F2, или же подвергаться повторному обратному скрещиванию с культивируемым растением родительской линии с получением поколения BC2. «Популяция M1» – это множество мутировавших семян/растений определенной растительной линии. «M2, M3, M4, и т.д.» относится к последовательным поколениям, полученным после самоопыления первых мутировавших семян/растений (M1).

[78] Растения *Solanum lycopersicum*, также называемые по тексту документа «растениями видов *Solanum lycopersicum*» или «растениями томата», являются многолетними в своем естественном районе распространения, но при этом культивируются, как однолетние. Культивируемые растения *Solanum lycopersicum*, как правило, вырастают высотой в 1-3 метра (3-10 футов). Плоды томата с ботанической точки зрения являются плодами типа ягоды и считаются съедобными овощами. Размер плода отличается в зависимости от сорта, а в ширину они могут быть от 1 до 10 см (примерно 0,5 - 4 дюйма). *Solanum lycopersicum* также известны, как *Lycopersicon lycopersicum* (L.) H. Karst. или *Lycopersicon esculentum* Mill. Термин «культивируемое растение томата» или «культивируемый томат» относится к растениям *Solanum lycopersicum*, например, к разновидностям, линиям скрещивания или сортам видов *S. lycopersicum*, культивируемым людьми и имеющим хорошие агрономические характеристики. Термин «дикие родственные формы *Solanum lycopersicum*» или «дикие родственники томатов» включает *S. arcanum*, *S. chmielewskii*, *S. neorickii* (= *L. parviflorum*), *S. cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. pimpinellifolium*, *S. chilense*, *S. corneliomulleri*, *S. habrochaites* (= *L. hirsutum*), *S. huaylasense*, *S. sisymbriifolium*, *S. peruvianum*, *S. hirsutum* или *S. pennellii*. Томат и его дикие родственники являются диплоидными растениями и имеют 12 пар гомологичных хромосом, которые пронумерованы от 1 до 12.

[79] Термин «культивируемое растение» или «сорт» относится к растениям конкретного вида, например, разновидности, линии скрещивания или сортам указанных видов, культивируемым людьми и имеющим хорошие агрономические характеристики. В качестве культурных растений так называемые наследственные разновидности или сорта томатов, т. е. перекрестноопыляемые разновидности или сорта, которые обычно выращивались в течение более ранних периодов истории человечества, и которые зачастую являются адаптированными к условиям специфического географического региона, в соответствии с одним аспектом изобретения считаются культивируемыми растениями. Термин «культивируемые растения» не охватывает растения дикого типа. «Растения дикого типа» включают, например, дикие образцы.

[80] Термин «продовольствие» относится к веществу, потребляемому для обеспечения питательной поддержки тела. Как правило, оно имеет растительное или животное происхождение и содержит важные питательные вещества, такие как углеводы, жиры, белки, витамины или минералы. Вещество принимается внутрь организмом и ассимилируется его клетками для выработки энергии, поддержания жизни и стимулирования роста. Термин «продовольствие» включает вещество, потребляемое для обеспечения питательной поддержки тела человека и животного.

[81] «Вегетативное размножение» или «клональное размножение» относится к размножению растений из растительной ткани, например, посредством размножения растений из отростков или размножения в искусственных условиях. Размножение в искусственных условиях включает культуру клетки или ткани в искусственных условиях и регенерацию всего растения из культуры в искусственных условиях. Таким образом, клоны (т.е., генетически идентичные виды растительного размножения) первоначального растения могут вырабатываться культурой в искусственных условиях. «Культура клетки» или «культура ткани» относится к культуре клеток или тканей растений *in vitro*. «Регенерация» относится к развитию растения из культуры клетки или культуры ткани или к вегетативному размножению. «Неспособная к размножению клетка» представляет собой клетку, которую нельзя регенерировать в целое растение.

[82] Термин «рекомбинация в мейозе» относится к генетической рекомбинации, включающей спаривание гомологичных хромосом, которое происходит у эукариот во время мейоза. Спаривание гомологичных хромосом может сопровождаться

передачей информации между указанными хромосомами. Данная передача информации может происходить без физического обмена (участок генетического материала копируется из одной хромосомы в другую без изменения донорной хромосомы) или посредством разрыва и повторного соединения цепей ДНК, в результате чего образуется вновь рекомбинированная молекула ДНК.

[83] «Среднее значение» в настоящем документе относится к среднему арифметическому значению.

[84] Очевидно, что сравнения между разными растительными линиями предусматривают рост ряда растений в пределах линии (или разновидности) (например, по меньшей мере, 5 растений, предпочтительно, по меньшей мере, 10 растений на одну линию) при одинаковых условиях, в качестве одной или нескольких контрольных растительных линий (предпочтительно, растений дикого типа) и выявление различий, предпочтительно, статистически значимых различий между растительными линиями при их выращивании в одинаковых условиях окружающей среды. Предпочтительно, растения относятся к одной линии или разновидности.

[85] В данном документе и его формуле глагол «содержать» и его конъюгации используются в неограниченном смысле, и это подразумевает, что пункты после слова включены, но пункты, которые не были упомянуты, также не исключены. Кроме того, при упоминании по тексту настоящего документа какого-либо элемента в единственном числе подразумевается также, что может присутствовать несколько таких элементов, за исключением случаев, когда из контекста очевидно следует, что присутствует лишь один такой элемент. Неопределенный артикль «а» или «an», таким образом, обычно означает, «по крайней мере, один». Далее подразумевается, что, когда речь идет о «последовательности» здесь, как правило, ссылаются на реальные физические молекулы с определенной последовательностью субъединиц (например, аминокислоты или нуклеиновые кислоты).

#### Растения по изобретению

[86] Настоящее изобретение относится к растению вида *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена мужской стерильности 10 (*MS10*) дикого типа и мутантный

аллель гена отсутствия антоциана (*AA*) дикого типа, причем в указанном растении частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, и мутантный аллель гена *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, и мутантный аллель гена *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа.

[87] Таким образом, растения с мужской стерильностью согласно настоящему изобретению могут быть надежно идентифицированы и/или отобраны на основе фенотипа гипокотилей указанного растения, т.е. путем определения того, отсутствует ли антоциановая окраска в гипокотилях, без необходимости подтверждения генотипа аллеля *MS10* для предотвращения отбора растений, которые демонстрируют признак отсутствия антоциана, но не признак мужской стерильности из-за рекомбинаций в мейозе. Доступные в настоящее время растения *Solanum lycopersicum*, в которых признак мужской стерильности сочетается с дополнительным признаком для визуальной идентификации растений с мужской стерильностью, не позволяют полностью надежно отобрать растения с мужской стерильностью из-за слишком частого возникновения событий рекомбинаций в мейозе, приводящих к появлению потомства, в котором теряется связь между признаком мужской стерильности и признаком визуальной идентификации.

[88] Соответственно настоящее изобретение относится к растению томата, отличающемуся тем, что рекомбинация в мейозе подавлена между мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и мутантным аллелем гена *AA* дикого типа. Соответственно, это означает, что в гетерозиготном растении согласно настоящему изобретению (т.е. в растении, содержащем одну мутантную хромосому 2,

содержащую мутантный аллель *MS10*, и мутантный аллель *AA*, содержащий инверсию и/или делецию в геномной области между указанным мутантным аллелем *MS10* и указанным мутантным аллелем *AA*, и одну хромосому дикого типа 2, содержащую аллель *MS10* дикого типа и аллель *AA* дикого типа) частота рекомбинаций в мейозе между мутантным аллелем *MS10* и мутантным аллелем *AA* снижается по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа. Частота рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа идентична частоте рекомбинаций в мейозе между мутантным аллелем *MS10* и мутантным аллелем *AA* в гетерозиготном растении *ms10-aa* в соответствии с известным уровнем техники, например, как описано в работе Zhang et al. Mol Breeding (2016) 36:107, которое не содержит инверсии и/или делеции в геномной области между мутантным аллелем *MS10* и мутантным аллелем *AA*. Термин «подавление рекомбинаций в мейозе» или «снижение частоты рекомбинаций в мейозе» по тексту настоящего изобретения указывает на то, что наблюдаемая скорость рекомбинаций в мейозе в гетерозиготном растении согласно настоящему изобретению меньше, чем скорость рекомбинаций в мейозе, которая ожидается с учетом физического расстояния между геном локуса *MS10* и геном локуса *AA* в растении дикого типа. Соответственно, растение согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой растение видов *Solanum lycopersicum*, содержащее в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена мужской стерильности 10 дикого типа (мутантный аллель *MS10*) и мутантный аллель гена отсутствия антоциана дикого типа (мутантный аллель *AA*), причем указанное растение содержит инверсию и/или делецию в геномной области между указанным мутантным аллелем *MS10* и указанным мутантным аллелем *AA*. Растение, содержащее инверсию, является предпочтительным по сравнению с растением, содержащим делецию, поскольку указанная делеция может привести к дополнительным нежелательным характеристикам в том случае, если она приведет к потере белковой функции других генов помимо *MS10* и *AA*.

[89] В растении по настоящему изобретению наблюдаемая скорость рекомбинаций в мейозе в гетерозиготном растении меньше, чем скорость рекомбинаций в мейозе, которая ожидается с учетом физического расстояния

между локусом гена *MS10* и локусом гена *AA* в растении дикого типа. Иными словами, частота рекомбинаций в мейозе в растениях и способах согласно настоящему изобретению считается пониженной по сравнению с растением *Solanum lycopersicum*, имеющим хромосому 2 дикого типа, когда генетическое расстояние между локусом мутантного аллеля гена *MS10* дикого типа и локусом мутантного аллеля гена *AA* дикого типа меньше генетического расстояния между локусом аллеля дикого типа гена *MS10* дикого типа и локусом аллеля дикого типа гена *AA* дикого типа. Генетическое расстояние между локусом аллеля дикого типа гена *MS10* дикого типа и локусом аллеля дикого типа гена *AA* дикого типа составляет около 7 сМ. Соответственно в настоящем изобретении, пониженная частота рекомбинаций в мейозе соответствует генетической дистанции между мутантным аллелем *ms10* и мутантным аллелем *aa*, которая составляет менее 7 сМ, т.е. не более 6,5 сМ, не более 6 сМ, не более 5,5 сМ, не более 5 сМ, не более 4,5 сМ, не более 4 сМ, не более 3,5 сМ, не более 3 сМ, не более 2,5 сМ, не более 2 сМ, не более 1,5 сМ, не более 1 сМ, не более 0,9 сМ, не более 0,8 сМ, не более 0,7 сМ, не более 0,6 сМ, не более не более 0,5 сМ, не более 0,4 сМ, не более 0,3 сМ, не более 0,2 сМ или не более 0,1 сМ. Предпочтительно, пониженная частота рекомбинаций в мейозе соответствует генетической дистанции между мутантным аллелем *ms10* и мутантным аллелем *aa* менее 6 сМ. Более предпочтительно, пониженная частота рекомбинаций в мейозе соответствует генетической дистанции между мутантным аллелем *ms10* и мутантным аллелем *aa* не более 1 сМ. Наиболее предпочтительно, пониженная частота рекомбинаций в мейозе соответствует генетической дистанции между мутантным аллелем *ms10* и мутантным аллелем *aa* не более 0,1 сМ.

[90] Существует несколько способов получения растения, в котором частота рекомбинаций в мейозе снижается между двумя локусами. В контексте настоящего изобретения рекомбинация в мейозе между двумя локусами, например, между геном *MS10* и геном *AA* считается подавленной, если частота рекомбинаций в мейозе между указанными локусами снижается по сравнению с растением дикого типа. В одном неограничительном примере в геноме может быть индуцирована делеция, приводящая к уменьшению физического расстояния между локусом мутантного аллеля гена *MS10* дикого типа и локусом мутантного аллеля гена *AA* дикого типа. В качестве альтернативы, рекомбинация в мейозе между двумя

локусами может быть подавлена интрогрессией фрагмента интрогрессии, расположенного между двумя локусами, причем указанный фрагмент интрогрессии имеет достаточно сниженную гомологию по сравнению с фрагментом дикого типа, что приводит к снижению рекомбинаций в мейозе. В особенно предпочтительном альтернативном варианте рекомбинация в мейозе между двумя локусами может быть подавлена в результате инверсии между указанными двумя локусами в одной из пар хромосом. В результате инверсии между двумя локусами нет гомологии, что и необходимо для возникновения рекомбинаций в мейозе. Соответственно, настоящее изобретение предпочтительно предоставляет виды растений *Solanum lycopersicum*, содержащие в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена *MS10* дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа, причем участок геномной ДНК между геном *MS10* и геном *AA* включает инверсию, в результате которой частота рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* снижается по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, и мутантный аллель гена *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, и мутантный аллель гена *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа.

[91] Соответственно, настоящее изобретение относится к растению вида *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена мужской стерильности 10 (*MS10*) дикого типа и мутантный аллель гена отсутствия антоциана (*AA*) дикого типа, причем в указанном растении частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном

*MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, например, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, (как определено с использованием методов, раскрытых в другом месте настоящего документа), и мутантный аллель гена *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, например, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, (как определено с использованием методов, раскрытых в другом месте настоящего документа), и мутантный аллель гена *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа.

[92] Растение *Solanum lycopersicum* настоящего изобретения, содержащее в своем геноме, по меньшей мере, одну копию хромосомы, содержащей мутантный аллель гена *MS10* дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа, причем частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа. Соответственно, растение по настоящему изобретению может быть гетерозиготным по признаку мужской стерильности и признаку отсутствия антоцианов по настоящему изобретению и поэтому включать одну хромосому дикого типа, содержащую аллель дикого типа гена *MS10* дикого типа и аллель дикого типа гена *AA* дикого типа в дополнение к хромосоме, содержащей мутантный аллель гена *MS10* дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа. Соответственно, гетерозиготные растения характеризуются наличием хромосомы, содержащей мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa*, между которыми частота рекомбинаций в мейозе снижается

по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа. Гомозиготные растения, демонстрирующие фенотип мужской стерильности и фенотип отсутствия антоцианов, могут быть легко получены из гетерозиготных растений, например, самоопылением. Растение по настоящему изобретению предпочтительно является гомозиготным для мутантного аллеля гена *MS10* дикого типа и гомозиготным для мутантного аллеля гена *AA* дикого типа.

[93] Мутантный аллель гена *MS10* дикого типа согласно настоящему изобретению приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа. Предпочтительно, мутантный аллель гена *MS10* дикого типа согласно настоящему изобретению приводит к отсутствию экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции по сравнению с белком дикого типа. Указанный мутантный аллель *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции, что приводит к полной потере функции белка и, таким образом, неизбежно индуцирует мужскую стерильность, когда присутствует в гомозиготной форме. В качестве альтернативы, мутантный аллель гена *MS10* дикого типа согласно настоящему изобретению приводит к снижению экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок, обладающий пониженной функцией по сравнению с белком дикого типа. Указанный мутантный аллель *MS10* дикого типа приводит к снижению экспрессии, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок, имеющий пониженную функцию, что приводит к снижению функции белка, которое является достаточным для того, чтобы вызвать мужскую стерильность, когда встречается в гомозиготной форме. Соответственно, мутантный аллель мужского гена *MS10* дикого типа (мутантный аллель *ms10*) согласно настоящему изобретению предпочтительно индуцирует мужскую стерильность, когда присутствует в гомозиготной форме.

[94] Мутантный аллель гена *AA* дикого типа согласно настоящему изобретению приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции

или снижением функции по сравнению с белком дикого типа. Предпочтительно, мутантный аллель гена *AA* дикого типа согласно настоящему изобретению приводит к отсутствию экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции по сравнению с белком дикого типа. Указанный мутантный аллель гена *AA* дикого типа, приводящий к отсутствию экспрессии, и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа, кодирующий белок с потерей функции, приводит к полной потере функции белка и, таким образом, неизбежно индуцирует гипокотили с отсутствием антоциана, в, когда присутствует в гомозиготной форме. В качестве альтернативы, мутантный аллель гена *AA* дикого типа согласно настоящему изобретению приводит к снижению экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок со сниженной функцией по сравнению с белком дикого типа. Указанный мутантный аллель гена *AA* дикого типа, приводящий к снижению экспрессии, и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа, кодирующий белок со сниженной функцией, приводит к значительному снижению функции белка гипокотили с отсутствием антоциана, когда присутствует в гомозиготной форме. Соответственно, мутантный аллель гена *AA* дикого типа (мутантный аллель *aa*) согласно настоящему изобретению предпочтительно индуцирует гипокотили с отсутствием антоциана, когда присутствует в гомозиготной форме.

[95] Растение *Solanum lycopersicum* согласно настоящему изобретению предпочтительно является гомозиготным для мутантного аллеля гена *MS10* дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа, причем частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа. Соответственно, растение *Solanum lycopersicum* по настоящему изобретению предпочтительно является гомозиготным для хромосомы, содержащей мутантный аллель гена *MS10* дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа, причем частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа. Предпочтительно, растение согласно настоящему изобретению представляет собой

инбредное растение, дигаплоидное растение или гибридное растение. В соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предусмотрено, что растение по настоящему изобретению является инбредным. Указанное инбредное растение является высоко гомозиготным, например, в результате повторного самоопыления и скрещивания. Такое инбредное растение может демонстрировать высокую эффективность в качестве материнского растения, на основе которого получают семена гибридов F1. В соответствии с одним аспектом изобретением предусмотрены гаплоидные растения и/или дигаплоидные растения (двойные гаплоиды), которые относятся к растениям по изобретению и содержат мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa*, как описано в тексте настоящего документа. Гаплоидные и дигаплоидные растения, к примеру, можно получить от другой или микроспоровой культуры, а также путем регенерации в целое растение. Для целей получения дигаплоидных растений может индуцироваться удвоение числа хромосом с использованием известных методов, таких как обработка колхицином и тому подобное. Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения предусмотрено растение вида *Solanum lycopersicum*, демонстрирующее фенотип мужской стерильности и отсутствия антоциана, как описано в настоящем документе, отличающееся тем, что это растение является дигаплоидным. Настоящее изобретение дополнительно предоставляет гибридные растения, которые могут иметь такие преимущества, как повышенная однородность, жизнеспособность и/или устойчивость к заболеваниям.

[96] Растения по настоящему изобретению могут применяться для получения плодов, особенно для получения семян гибрида F1. Таким образом, настоящим изобретением предусмотрено использование растения вида *Solanum lycopersicum* для производства семян, как предусмотрено в настоящем документе. В частности, плоды, производимые растениями по настоящему изобретению, можно с преимуществами использовать для получения семян, поскольку при получении семян ручное кастрирование цветков для предотвращения самоопыления не требуется.

[97] Растения по настоящему изобретению могут применяться для получения материала для размножения. Такой материал для размножения содержит материал для размножения, который подходит для и/или является результатом полового размножения, как, например, пыльца или семена. Такой материал для размножения

содержит материал для размножения, который подходит для и/или является результатом бесполого или вегетативного размножения, включая, помимо прочего, отростки, привитые части растений, клубни, клеточные культуры или тканевые культуры. Таким образом, настоящим изобретением предусмотрено использование растения вида *Solanum lycopersicum*, в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, в качестве источника материала для размножения.

[98] Настоящим изобретением предусмотрены семена, из которых можно вырастить растение по настоящему изобретению. Кроме того, изобретение предоставляет множество таких семян. Семя по изобретению можно отличить от других семян по наличию по крайней мере одной хромосомы, содержащей мутантный аллель гена мужской стерильности 10 (*MS10*) дикого типа и мутантный аллель гена отсутствия антоциана (*AA*) дикого типа, причем в указанном растении частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, как описано в настоящем документе, либо фенотипически на основе растений, имеющих признак мужского бесплодия в сочетании с признаком отсутствия антоциана по настоящему изобретению) и/или с использованием молекулярных методов для обнаружения мутантного аллеля в клетках или тканях, таких как методы молекулярного генотипирования для выявления мутантного аллеля по настоящему изобретению или секвенирование. К семенам, к примеру, относятся семена, получаемые от растения по изобретению, которое является гетерозиготным по мутантному аллелю после самоопыления, и в некоторых случаях, выборка семян, которые содержат одну или две копии мутантных аллелей *ms10* и *aa* (например, при помощи неразрушающих методов отбора образцов семян и анализа присутствия мутантных аллелей *ms10* и *aa*), или семена, полученные после перекрестного опыления, напр., опыления растения по изобретению пыльцой другого пасленового растения, предпочтительно от другого растения вида *Solanum lycopersicum*, или другого растения *Solanum lycopersicum* пыльцой растения по изобретению.

[99] В частности, настоящее изобретение предоставляет пыльцу или семя, вырабатываемые растением согласно настоящему изобретению, или семя, из которого может быть выращено растение согласно изобретению, предпочтительно

является гомозиготным видов *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена мужской стерильности 10 (*MS10*) дикого типа и мутантный аллель гена отсутствия антоциана (*AA*) дикого типа, причем в указанном растении частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, например, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, (как определено с использованием методов, раскрытых в другом месте настоящего документа), и мутантный аллель гена *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, например, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, (как определено с использованием методов, раскрытых в другом месте настоящего документа), и мутантный аллель гена *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа.

[100] В частности, настоящее изобретение предоставляет пыльцу или семена, производимые растением согласно настоящему изобретению, или семя, из которого может быть выращено растение согласно изобретению, причем пыльца или семя содержит мутантный аллель гена *MS10* дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа, причем частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа.

Соответственно настоящее изобретение предоставляет семя, из которого можно вырастить растение согласно настоящему изобретению.

[101] В соответствии с одним аспектом изобретения, множество семян упаковывают в тару (напр., мешок, картонную коробку, банку и т.д.) Тара может быть любого размера. Перед упаковкой семена могут гранулироваться (для образования окатышей или гранул) и/или обрабатываться различными составами, включая инкрустацию семян.

[102] В рамках еще одного аспекта предусмотрена часть растения, которая получена (или которую можно получить) из растения по изобретению, как предусмотрено настоящим документом, и тара или упаковка, содержащая указанную часть растения.

[103] В частности, настоящее изобретение предоставляет часть из растения по настоящему изобретению, причем часть содержит в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена *MS10* дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа, причем в указанном растении частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, например, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, (как определено с использованием методов, раскрытых в другом месте настоящего документа), и мутантный аллель гена *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, например, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, (как определено с использованием методов, раскрытых в другом месте настоящего документа), и мутантный аллель гена *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или

сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена AA дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа. Предпочтительно, часть растения выбрана из группы, состоящей из листа, пыльника, пестика, стебля, черешка, корня, семяпочки, пыльцы, микроспоры, протопласта, каллуса, ткани, семени, цветка, семядоли, гипокотилия, зародыша или клетки. Различные стадии развития вышеуказанных частей растения содержатся в изобретении. Настоящее изобретение соответственно предоставляет часть растения согласно настоящему изобретению. Предпочтительно указанная часть растения согласно настоящему изобретению представляет собой лист, пыльник, пестик, стебель, черешок, корень, семяпочку, пыльцу, микроспору, протопласт, каллус, ткань, семя, цветок, семядолю, гипокотиль, зародыш или клетку.

[104] В еще одном аспекте изобретения, часть растения представлена клеткой растения. В еще одном дальнейшем аспекте изобретения, часть растения представлена клеткой, которая способна или неспособна к регенерации. В еще одном аспекте изобретения клетка растения представляет собой соматическую клетку.

[105] Клетка, которая не обладает способностью к регенерации, представляет собой клетку, которую нельзя регенерировать в целое растение *in vitro*. Клетка без способности к регенерации может содержаться в растении или части растения (например, листьях) по настоящему изобретению. Клетка без способности к регенерации может представлять собой клетку в семени или оболочке указанного семени. Зрелые органы растений, включая зрелый лист, зрелый стебель или зрелый корень, содержат, по меньшей мере, одну клетку без способности к регенерации.

[106] В еще одном аспекте клетка растения представляет собой репродуктивную клетку, такую как семязачаток или клетку, которая является частью пыльцы. В соответствии с одним из аспектов изобретения, клетка пыльцы представляет собой вегетативную (нерепродуктивную) клетку или семенную клетку (Tiezzi, *Electron Microsc. Review*, 1991). Такая репродуктивная клетка является гаплоидом. При регенерации в целое растение она содержит гаплоидный геном исходного растения. В случае хромосомного дублирования (напр., в результате химической обработки), в результате регенерации может быть получено гаплоидное растение. В одном аспекте растение по изобретению, содержащее мутантный аллель гена *MS10*

дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа, представляет собой гаплоидное или аллодиплоидное растение *Solanum lycopersicum* согласно настоящему изобретению.

[107] Кроме того, предусмотрена клеточная культура *in vitro* или тканевая культура растения *Solanum lycopersicum* по изобретению, при которой клеточную или тканевую культуру получают из описанной выше части растения, такой как, например, но не ограничиваясь, лист, пыльца, зародыш, семядоля, гипокотиль, каллус, корень, кончик корня, пыльник, цветок, семя или стебель, либо их часть, либо меристематическая клетка, соматическая клетка или репродуктивная клетка.

[108] Настоящее изобретение дополнительно предоставляет вегетативно размножаемое растение, отличающееся тем, что указанное растение размножается из части растения согласно настоящему изобретению.

[109] Кроме того, предусмотрены изолированные клетки, клеточные культуры *in vitro* и тканевые культуры, культуры протопластов, части растений, материал, собираемый в качестве урожая (напр., собираемые плоды томатов), пыльца, завязи, цветки, семена, тычинки, части цветка и т.д., в состав каждой клетки которых входит не менее одной хромосомы, содержащей мутантный аллель *aa* по настоящему изобретению. Таким образом, когда указанные клетки или ткани регенерируют или выращивают в целое растение *Solanum lycopersicum*, это растение содержит мутантный аллель, способный индуцировать мужскую стерильность и гипокотили с отсутствием антоциана, когда присутствует в гомозиготной форме.

[110] Таким образом, предусмотрена клеточная культура *in vitro* и/или тканевая культура клеток растений или тканей растений по изобретению. Клеточная или тканевая культура может подвергаться обработке стимуляторами роста побегов или корней для регенерации растения *Solanum lycopersicum*.

[111] Настоящее изобретение также охватывает вегетативное или клональное размножение растений по настоящему изобретению. Существует целый ряд различных методов вегетативного размножения. Например, для культур *in vitro* в соответствии с описанием выше могут использоваться отростки (узелки, верхушки побегов, стебли). Кроме того, могут применяться другие способы вегетативного размножения, такие как прививание или получение воздушных отводков. В рамках

получения воздушных отводков части стебля дают возможность сформировать корни в то время, как она все еще соединена с материнским растением, а после того, как корни сформировались, клональное растение отделяется от материнского.

[112] Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения предусмотрен способ, который включает в себя:

- (a) получение части растения по изобретению (напр., клеток или тканей, напр., отростков),
- (b) вегетативное размножение части указанного растения для получения точно такого же растения на основании части растения.

[113] Таким образом, использование вегетативных частей растений по изобретению для клонального/вегетативного размножения также является вариантом осуществления изобретения. В соответствии с одним аспектом изобретения предоставляется способ вегетативного размножения растения *Solanum lycopersicum* по изобретению, включающего две копии хромосомы, содержащей мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa* по настоящему изобретению, причем частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* по сравнению с частой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, как описано в настоящем документе. Кроме того, предоставляется вегетативно полученное растение включает две копии хромосомы, содержащей мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa* по настоящему изобретению, отличающейся тем, что частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* по сравнению с частой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, как описано в настоящем документе.

[114] В соответствии с еще одним аспектом растение по изобретению, включающее две копии хромосомы, содержащей мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa* по настоящему изобретению, отличающейся тем, что частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* по сравнению с частой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, как описано в настоящем документе, размножается с использованием методов соматического эмбриогенеза.

[115] Также предусмотрено растение *Solanum lycopersicum*, регенерированное из любой из описанных выше частей растения или регенерированное из описанных выше культур клеток или тканей, при этом указанное регенерированное растение содержит в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена *MS10* дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа, причем в указанном растении частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа, причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, например, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, (как определено с использованием методов, раскрытых в другом месте настоящего документа), и мутантный аллель гена *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, например, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, (как определено с использованием методов, раскрытых в другом месте настоящего документа), и мутантный аллель гена *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа. Предпочтительно, регенерированное растение является гомозиготным по хромосоме, содержащей мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa* по настоящему изобретению, отличающейся тем, что частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* по сравнению с частой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, как описано в настоящем документе, и, таким образом, это растение обладает мужской стерильностью в сочетании с отсутствием антоцианов в гипокотильях.

Способы выявления и/или выбора растения или части растения

[116] В еще одном варианте реализации изобретения предусмотрены растения и части растений вида *Solanum lycopersicum* по изобретению, а также потомство растения *Solanum lycopersicum* по изобретению, например, выращенное из семян, полученных в результате полового или вегетативного размножения, регенерированное из описанных выше частей растений, либо регенерированное из клеточной или тканевой культуры, для которого воспроизводимое (для размножения семенами или вегетативного размножения) растение содержит, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa* по настоящему изобретению, при этом частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, как описано в настоящем документе.

[117] Настоящее изобретение дополнительно предоставляет растение видов *Solanum lycopersicum* выращенное из семян в соответствии с описанием в настоящем документе. Таким образом, настоящим изобретением предусмотрено растение *Solanum lycopersicum*, которое выращивается из семян с использованием способа получения растения *Solanum lycopersicum*, описанного в настоящем документе.

[118] Кроме того, изобретением предусмотрено потомство, для которого характерен или которое сохраняет признак мужской стерильности и признак отсутствия антоциана в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе (которые передаются мутированным аллелем *ms10* и, соответственно, мутантным аллелем *aa*), такое как потомство, получаемое в результате, например, однократного или многократного самоопыления или перекрестного опыления растения по изобретению с другим растением *Solanum lycopersicum* другой разновидности или линии скрещивания того же вида растений (либо вида растений, который может скрещиваться с растением *Solanum lycopersicum* по настоящему изобретению), либо однократно или многократно с растением *Solanum lycopersicum* по изобретению. В частности, изобретение предоставляет потомство, которое является гомозиготным по хромосоме, содержащей мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa* по настоящему изобретению, отличающейся тем, что частота

рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* по сравнению с частой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, как описано в настоящем документе, и, таким образом, это растение обладает мужской стерильностью в сочетании с отсутствием антоцианов в гипокотилиях. В соответствии с одним аспектом изобретение относится к потомству растения, содержащему хромосому, содержащую мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa* по настоящему изобретению, причем частота рекомбинаций в мейозе между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* меняется по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, как описано в настоящем документе, например, растение-потомство, полученное из растения *Solanum lycopersicum*, содержащего хромосому, содержащую мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa*, причем частота рекомбинаций в мейозе между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* снижается по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа одним или несколькими методами, выбранными из группы, состоящей из: самоопыления, скрещивания, мутации, получения двойного гаплоида или трансформации. Предпочтительными мутациями являются антропогенные мутации и соматоклональные мутации. В одном варианте осуществления растения или семена изобретения также могут подвергаться мутациям (напр., в результате облучения, химического мутагенеза, теплообработки, TILLING подхода, целенаправленного мутагенеза и т.д.) и/или могут отбираться мутированные семена или растения (например, соматоклональные варианты и т.д.) с целью изменения одной или нескольких характеристик растений. Аналогичным образом, растения по изобретению могут подвергаться трансформации или регенерации, при которых в растения вводятся один или несколько химерных генов. Трансформация осуществляется с использованием стандартных методов, таких как трансформация посредством *Agrobacterium tumefaciens* или баллистической трансфекции, после чего выполняется селекция трансформированных клеток и регенерация в растения. Желательные признаки (например, гены, передающие резистентность к заболеваниям, вредителям, гербицидам, фунгицидам или инсектицидам и т.д.) может быть придан растениям

или их потомству путем трансформации растения по изобретению или его потомства при помощи трансгена, который придает желательное свойство, отличающееся тем, что трансформированное растение сохраняет хромосому, содержащую мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa*, при этом снижается частота рекомбинаций в мейозе между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa*, как описано в настоящем документе, и, когда хромосома, содержащая мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa*, отличающаяся тем, что частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa*, растение содержится в гомозиготной форме, сохраняется передаваемый фенотип мужской стерильности и отсутствия антоцианов, и растение содержит желаемый признак.

[119] В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения семян, который включает в себя скрещивание растения по изобретению с самим собой или другим растением, а также сбор полученных в результате семян. В соответствии с еще одним вариантом реализации изобретение относится к получению семян с использованием настоящего способа и/или растения, полученного в результате выращивания таких семян. Таким образом, растение по изобретению может использоваться в качестве материнского растения женского и/или мужского пола для получения семян и в этом случае растения, выращенные из указанных семян включают хромосому, содержащую мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa*, причем частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa*, как предусмотрено в настоящем документе.

[120] Таким образом, в соответствии с одним аспектом, предусмотрено потомство растения *Solanum lycopersicum* по изобретению, и в этом случае растение-потомок получают в результате самоопыления, скрещивания, мутации, получения двойных гаплоидов или трансформации, предпочтительно с сохранением у потомства хромосомы, содержащей мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa*, при этом частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, как предусмотрено настоящим изобретением.

[121] Настоящее изобретение дополнительно предоставляет способ выявления и/или выбора растения с мужской стерильностью, при этом указанный способ включает выращивание растения согласно настоящему изобретению и определение того, отсутствует ли антоциан в гипокотылях указанного растения.

[122] Настоящее изобретение дополнительно предоставляет способ выявления и/или выбора растения по настоящему изобретению или части растения по настоящему изобретению. Настоящее изобретение соответственно далее предоставляет способ выявления и/или выбора растения или части растения видов *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена *MS10* дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа, причем в указанном растении частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, например, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, (как определено с использованием методов, раскрытых в другом месте настоящего документа), и мутантный аллель гена *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, например, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, (как определено с использованием методов, раскрытых в другом месте настоящего документа), и мутантный аллель гена *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем указанный способ включает определение того, был ли модифицирован участок геномной ДНК между геном *MS10* и геном *AA*, в

результате чего частота рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* снижается по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа.

[123] Как описано в настоящем документе, растение или часть растения видов *Solanum lycopersicum* по настоящему изобретению и используемые в способах, описанных в настоящем документе, *содержащие в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель* гена мужской стерильности 10 (*MS10*) дикого типа и мутантный аллель гена отсутствия антоциана (*AA*) дикого типа, предпочтительно включает инверсию и/или делецию в геномной области между указанным мутантным аллелем *MS10* и указанным мутантным аллелем *AA*.

[124] Этот способ включает скрининг на уровне ДНК, РНК (или кДНК) или белка с использованием известных методов обнаружения присутствия одного или нескольких мутантных аллелей согласно настоящему изобретению и/или хромосомы, содержащей мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa*, причем рекомбинация в мейозе между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* подавлена. Существует много методов обнаружения мутантного аллеля гена.

[125] 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 ПЦР, 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-специфичных прямых праймера и один аллель-специфический обратный праймер. Смотрите, например, Allen et al. 2011, *Plant Biotechnology J.* 9, 1086-1099, в частности, p097-1098 для метода анализа аллель-специфической ПЦР.

[126] 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.

[127] Молекулярные маркеры также могут использоваться в качестве дополнительного инструмента идентификации растений (либо частей растений или получаемых из них нуклеиновых кислот), содержащих мутантный аллель *ms10* и/или мутантный аллель *aa*, и/или хромосому, содержащую мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa*, причем рекомбинация в мейозе между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* подавлена. Молекулярные маркеры также могут использоваться в качестве дополнительного инструмента идентификации растений (либо частей растений или получаемых из них нуклеиновых кислот), содержащих мутантный аллель *ms10* и/или мутантный аллель *aa*, и/или хромосому, содержащую мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa*, причем рекомбинация в мейозе между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* подавлена. Наиболее предпочтительно в качестве молекулярного маркера используют мутацию причинного гена для идентификации растений (либо частей растений или получаемых из них нуклеиновых кислот), содержащих мутантный аллель *ms10* и/или мутантный аллель *aa*, и/или хромосому, содержащую мутантный аллель *ms10* и мутантный аллель *aa*, причем рекомбинация в мейозе между указанным мутантным аллелем *ms10* и указанным мутантным аллелем *aa* подавлена. Подходящие молекулярные маркеры могут быть выбраны на основе доступной генетической информации о мутантных растениях. Если генетическая информация о мутантных растениях отсутствует, подходящие молекулярные маркеры могут быть получены путем скрещивания растения *Solanum lycopersicum* согласно настоящему изобретению (предпочтительно имеющего признак мужской стерильности, надежно связанный с признаком отсутствия антоциана) с растением дикого типа и разработки в результате такого скрещивания расщепляющейся популяции (например, популяции F2 или популяции обратного скрещивания). Расщепляющаяся популяция затем может быть фенотипирована по фенотипу отсутствия антоциана (или, альтернативно, мужской стерильности), как описано в настоящем документе, а также генотипирована с использованием молекулярных маркеров, таких как ОНП (однонуклеотидный полиморфизм), ПДАФ (полиморфизм длины амплифицированных фрагментов; см., например, EP 534 858), или другим, а также

на основе программного анализа можно определить молекулярные маркеры, которые со-расщепляют признаки по настоящему изобретению, а также установить их порядок и генетическую отдаленность (сантиморганида, сМ) от гена *MS10* (или локуса). Молекулярные маркеры, которые тесно сцеплены с локусом *MS10*, например, маркеры на отдаленности 5 сМ или меньше, могут впоследствии использоваться для выявления или отбора растений (например, растений по изобретению или потомства растения по изобретению) либо частей растений, которые содержат или сохраняют мутантный аллель *ms10* (например, в рамках фрагмента интрогрессии). Такие тесно сцепленные молекулярные маркеры могут замещать фенотипический отбор (или использоваться в дополнение к фенотипическому отбору) в рамках программ селекции, т.е. маркерной селекции (МС). Сцепленные маркеры предпочтительно используются в МС. Более предпочтительно, в МС используются фланкирующие маркеры, например, по одному маркеру на каждой стороне локуса мутантного аллеля *ms10*.

[128] Способ выявления и/или выбора растения или части растения по настоящему изобретению, соответственно, включает определение того, был ли модифицирован участок геномной ДНК между геном *MS10* и геном *AA*, что привело к снижению частоты рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA*, как описано в настоящем документе. В соответствии с описанием выше по тексту настоящего документа существует несколько способов получения растения, в котором частота рекомбинаций в мейозе снижается между двумя локусами. Соответственно, должен быть отдельно выбран этап способа определения того, был ли модифицирован участок геномной ДНК между геном *MS10* и геном *AA* для достижения снижения частоты рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA*. Например, в геноме может быть индуцирована делеция, приводящая к уменьшению физического расстояния между локусом мутантного аллеля гена *MS10* дикого типа и локусом мутантного аллеля гена *AA* дикого типа. Соответственно, используя стандартные методы, хорошо известные специалистам в данной области, устанавливают, изменяется ли физическое расстояние между мутантным геном *MS10* и мутантным геном *AA*. В качестве альтернативы, частота рекомбинаций в мейозе между двумя локусами может быть подавлена интрогрессией фрагмента интрогрессии, расположенного между двумя локусами, причем указанный фрагмент интрогрессии имеет достаточно сниженную

гомологию по сравнению с фрагментом дикого типа, что приводит к снижению частоты рекомбинаций в мейозе. Соответственно, используя стандартные методы, устанавливают, присутствует ли негомологичный фрагмент интрогрессии между мутантным геном *MS10* и мутантным геном *AA*. Предпочтительно частота рекомбинаций в мейозе между двумя локусами подавляется в результате инверсии между указанными двумя локусами в одной из пар хромосом. Соответственно, используя стандартные методы, устанавливают, присутствует ли инверсия между мутантным геном *MS10* и мутантным геном *AA*. Соответственно, настоящее изобретение предпочтительно предоставляет способ выявления и/или выбора растения или части растения видов *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена *MS10* дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа, причем в указанном растении частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, например, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, (как определено с использованием методов, раскрытых в другом месте настоящего документа), и мутантный аллель гена *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, например, 96%, 97%, 98%, 98.3%, 98.7%, 99.0% или 99.3% или более предпочтительно 99.7% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, (как определено с использованием методов, раскрытых в другом месте настоящего документа), и мутантный аллель гена *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и причем указанный способ включает определение того,

включает ли участок геномной ДНК между геном *MS10* и геном *AA* инверсию, что приводит к тому, что частота рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* снижается по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа.

[129] Предпочтительно, способ выявления и/или выбора растения или части растения видов *Solanum lycopersicum* согласно настоящему изобретению включает предшествующий этап способа, на котором индуцируется двухцепочечный разрыв в или рядом с геном *MS10* дикого типа для получения мутантного аллеля гена *MS10* дикого типа, и/или двухцепочечный разрыв индуцируется в гене *AA* дикого типа или рядом с ним, чтобы обеспечить мутантный аллель гена *AA* дикого типа до определения того, был ли модифицирован участок геномной ДНК между геном *MS10* и геном *AA*, в результате чего частота рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* снижается. Указанный этап индуцирования двухцепочечного разрыва может включать контактирование указанного растения или части растения с модифицированной нуклеазой, после которого указанный двухцепочечный разрыв может быть восстановлен за счет применения механизмов репарации двухцепочечных разрывов эндогенной ДНК клетки (напр., механизм репарации, направляемой гомологией), что позволяет выполнять сайт-специфичную делецию, или инверсию ДНК в целевой клетке. К модифицированным нуклеазам, которые используются в рамках методов редактирования генома, относятся мегануклеазы, цинк-пальцевые нуклеазы (ЦПН), нуклеазы на основе эффекторов, подобных активаторам транскрипции и нуклеазы, ассоциированные с короткими палиндромными повторами, регулярно расположенные группами (CRISPR). К методам редактирования генома, которые демонстрируют особую эффективность в контексте настоящего изобретения, относятся, помимо прочего, методы направленного мутагенеза на основе CRISPR/Cas9 и методы направленного мутагенеза на основе CRISPR/Cas12 (также известного как CRISPR/Cpf1); смотрите, например, Brooks et al. (2014) *Plant Physiol* 166, 1292-1297 и WO2016/205711 A1.

[130] Этап способа определения того, был ли модифицирован участок геномной ДНК между геном *MS10* и геном *AA*, в результате чего частота рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* снижается, предпочтительно включает

определение того, содержит ли растение или часть растения инверсию или делецию фрагмента геномной ДНК, расположенного между геном *MS10* и геном *AA*.

[131] Предпочтительно, способ выявления и/или выбора растения или части растения видов *Solanum lycopersicum* согласно настоящему изобретению включает предшествующий этап способа, на котором индуцируется двухцепочечный разрыв в гене *MS10* дикого типа или рядом с ним для получения мутантного аллеля гена *MS10* дикого типа, и при этом двухцепочечный разрыв индуцируется в гене *AA* дикого типа или рядом с ним, чтобы получить мутантный аллель гена *AA* дикого типа до определения того, был ли модифицирован участок геномной ДНК между геном *MS10* и геном *AA*, в результате чего частота рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* снижается.

[132] Настоящее изобретение дополнительно предоставляет способ производства растения или части растения с мужской стерильностью и гипокотиллями с отсутствием антоциана, причем в указанном растении или части растения частота рекомбинаций в мейозе между свойством мужской стерильности и свойством гипокотилей с отсутствием антоциана снижается, при этом указанный способ включает: (а) индуцирование в растение или часть растения двухцепочечного разрыва как в ген *MS10*, так и в ген *AA*, причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, и причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3; (б) при необходимости, регенерацию части растения, в которой двухцепочечный разрыв индуцируется в растение или различную часть растения. В способе получения растения или части растения с мужской стерильностью и гипокотиллями с отсутствием антоциана двухцепочечный разрыв как в гене *MS10*, так и в гене *AA* предпочтительно индуцируют с использованием сконструированной эндонуклеазы. Предпочтительно, двухцепочечный разрыв индуцируется с использованием сконструированной эндонуклеазы, причем указанная сконструированная эндонуклеаза предпочтительно представляет собой мегануклеазу, нуклеазу цинкового пальца (ZFN), нуклеазу на основе эффектора, подобную активатору транскрипции (TALEN), или нуклеазу, ассоциированную с кластеризованными регулярными интервалами коротких палиндромных повторов (CRISPR).

[133] В соответствии с описанием, индукция двухцепочечного разрыва как в гене *MS10*, так и в гене *AA* может вызвать делецию фрагмента геномной ДНК, расположенного между двухцепочечными разрывами, или инверсию фрагмента геномной ДНК, расположенного между двухцепочечными разрывами. Однако при этом в контексте настоящего изобретения изобретения двухцепочечный разрыв как в гене *MS10*, так и в гене *AA* предпочтительно индуцирует инверсию и/или делецию фрагмента геномной ДНК, расположенного между двухцепочечными разрывами. Инверсию является предпочтительной по сравнению с делецией, поскольку указанная делеция может привести к дополнительным нежелательным характеристикам в том случае, если она приведет к потере белковой функции других генов помимо *MS10* и *AA*.

[134] Для применения известных способов индукции двухцепочечного разрыва с использованием сконструированной эндонуклеазы необходимо, чтобы растение или часть растения были (на короткое время) трансформированы. Предпочтительно, двухцепочечный разрыв индуцируется в протопласте, каллусе или микроспоре. Трансформация осуществляется с использованием стандартных методов, таких как трансформация посредством *Agrobacterium tumefaciens* или баллистической трансфекции, после чего выполняется селекция трансформированных клеток и регенерация в растения.

[135] Двухцепочечные разрывы, индуцированные в способе получения растения или части растения с мужской стерильностью и гипокотильями с отсутствием антоциана согласно настоящему изобретению, предпочтительно влекут за собой появление мутантного аллеля мужского гена *MS10* дикого типа и мутантного аллеля гена *AA* дикого типа, в соответствии с более подробным описанием выше по тексту настоящего документа, а также подавление рекомбинаций в мейозе между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа, описание которого приводится в настоящем документе, например, посредством индуцирования делеции или инверсии. Соответственно, двухцепочечный разрыв, индуцированный в ген *MS10* дикого типа, предпочтительно приводит к отсутствию экспрессии или снижению экспрессии гена *MS10* и/или к потере функции или снижению функции белка, кодированного указанным геном *MS10*; и/или двухцепочечный разрыв, индуцированный в гене *AA* дикого типа предпочтительно приводит к отсутствию

экспрессии или снижению экспрессии гена *AA* и/или к потере функции или снижению функции белка, кодируемого указанным геном *AA*. Еще более предпочтительно, двухцепочечный разрыв, индуцированный в ген *MS10* дикого типа, приводит к отсутствию экспрессии гена *MS10* и/или к потере функции белка, кодируемого указанным геном *MS10*; и/или двухцепочечный разрыв, индуцированный в гене *AA* дикого типа, приводит к отсутствию экспрессии гена *AA* и/или к потере функции белка, кодируемого указанным геном *AA*.

[136] В соответствии с одним аспектом части растения и клетки растения по настоящему изобретению получены не исключительно посредством биологического процесса в соответствии с определением в правиле 28(2) Европейской патентной конвенции.

## ПРИМЕРЫ

### ПРИМЕР 1

#### Проектирование и клонирование конструктов

[137] Для проектирования гРНК для *MS* мы использовали первый экзон *MS*. Для проектирования гРНК для *AA* мы использовали первый и второй экзон данного гена. Для каждого гена мы разработали две гРНК (таблица 1), с использованием программного обеспечения CRISPOR (<http://crispor.tefor.net>).

**Таблица 1. гРНК для создания двухцепочечных разрывов ДНК в гене мужской стерильности *MS* и в гене отсутствия антоциана *AA*, оба на Ch02.**

Целевой ген	название	гРНК	Положение SL3.0ch02
<i>MS</i>	gMS1	GGCGTCAAAAАCTTAGCGAA AGG (SEQ ID NO: 5)	44796492
<i>MS</i>	gMS2	ATACAAATCCAAGAACCTTA AGG (SEQ ID NO: 6)	44796528
<i>AA</i>	gAA1	GAAAGTGTATGGTTCAGCAA TGG (SEQ ID NO: 7)	45896386
<i>AA</i>	gAA2	CAATGGCTGCATGTCCACAA AGG (SEQ ID NO: 8)	45896403

[138] Было создано два конструкта CRISPR-Cas, объединяющие одну гРНК для *AA* и одну для *MS*. Конструкт 1 содержал gMS1 и gAA1, в Конструкте 2 содержались gMS2 и gAA2.

[139] Конструкты CRISPR-Cas были сформированы путем клонирования с использованием набора инструментов Golden Gate MoClo Toolkit (<https://www.addgene.org/kits/marillonnet-moclo/>). Сконструированные гРНК были заказаны как олигонуклеотиды, и каждый из них был вставлен отдельно за промотором U6-26 из *Arabidopsis thaliana* (плазмида pICSL90002, <https://www.addgene.org/68261/>). Объединяли гРНК с промотором и последовательность *Arabidopsis SpCas9* с оптимизированным кодоном под промотором *Petroselinum crispum Ubiquitin4-2* и терминатором NOS (pDe-CAS9, <https://www.addgene.org/61433/>). Для оценки доли успешно трансфицированных протопластов в конструкт CRISPR-Cas мы включили флуоресцентный ген *GFP* (p35S-fGFP-ter35S), управляемый промотором и терминатором CaMV-35S.

#### **Выделение плазмиды, содержащей конструкт CRISPR-Cas 1 или 2**

[140] Плазмиды, содержащие два конструкта CRISPR-Cas, размножали в *Escherichia coli* (25 мл LB) и выделяли с использованием миди-набора плазмид QIAGEN (Cat No./ID: 12143) в соответствии с описанием в руководстве.

[141] Плазмидную ДНК элюировали в 200 мкл буфера EB и рассчитывали ее количество с использованием прибора Nanodrop One (производства ThermoFisher). Для трансфекции 10 мкг плазмиды пипеткой помещали в пробирку на 2 мл и добавляли воду до достижения объема в 20 мкл.

#### **Выращивание растений**

[142] Семена томатов сорта «Маниберг» стерилизовали в 1% растворе хлорной извести в течение 20 минут (при комнатной температуре). После стерилизации семена промывали водой MilliQ (2 минуты при комнатной температуре). Семена высевали на среду для проращивания (1/2 МС, включая витамины (Duchefa), 1% сахарозы и 0,8% агара Daishin, pH 5,8) в стерильные сосуды для эксплантации (OS140BOX/зеленый фильтр, Duchefa), 4 семени на сосуд. Растения выращивали в условиях длинного дня.

### **Выделение и промывание протопластов**

[143] В качестве исходного материала для выделения протопластов использовали растения 2-3-месячного возраста. Несколько (4-5) листьев отрезали скальпелем и пинцетом и поместили в чашку Петри диаметром 9 см, содержащую 10 мл буферного раствора для гидролиза (0,4 М маннита, 20 mM MES, 20 mM KCL и 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5,7). Листья вырезали в виде перьев от средней жилки к краю листа (лезвие скальпеля 11). Это действие повторяли до тех пор, пока не была покрыта вся поверхность чашки Петри (приблизительно 15-20 листьев), что обычно достаточно для 25 трансфекций. После разрезания листьев буфер для расщепления удаляли с помощью серологической пипетки и добавляли 10 мл (свежеприготовленного) буфера для расщепления с 0,25% мацерозимом R10 (2,5 г/л, M8002 Duchefa Biochemie) и 1% целлюлазой R10 (10 г/л, C8001 Duchefa Biochemie) добавляли в чашку Петри. Планшеты инкубировали в темном помещении в течение 16-18 часов при 25°C.

[144] Перед началом процедуры промывки и трансфекции готовили раствор ПЭГ путем смешивания 4,0 г ПЭГ-4000 (Fluka), 3,0 мл MilliQ, 2,5 мл 0,8 М раствора маннита и 1,0 мл 1 М раствора CaCl<sub>2</sub> в пробирке объемом 50 мл (и помещали ее на роликтовую мешалку).

[145] После данной инкубации планшет осторожно вращали рукой в горизонтальном направлении (около 30 раз), чтобы обеспечить высвобождение протопластов. С помощью серологической пипетки на 25 мл суспензию протопластов осторожно пропускали через клеточный фильтр Falcon 100 мкм (Corning) и аккуратно собирали в пробирку объемом 50 мл. В чашку Петри добавили 10 мл промывочного буфера W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5 mM KCL и 2 mM MES, pH 5,7), после чего чашку встряхнули 30 раз для высвобождения дополнительных протопластов. Эту суспензию снова пропустили через клеточный фильтр с помещением в ту же пробирку на 50 мл. Пробирку центрифугировали при 100xg в течение 3 минут при комнатной температуре для осаждения протопластов (пауза и ускорение центрифуги были установлены на 6, Eppendorf 5810R). Надосадочную жидкость быстро сливали и в пробирку добавляли 10 мл буфера W5 (пипеткой по стенке пробирки). Протопласты осторожно ресуспендировали, медленно поворачивая пробирку. Этап промывки повторяли один раз. После второй промывки протопласты ресуспендировали в 10

мл раствора ММg (0,4 М маннитола, 15 мМ MgCl<sub>2</sub> и 4 мМ MES, pH 5,7), центрифугировали 3 минуты при 100xg при комнатной температуре и ресуспендировали в 10 мл раствора ММg. Протопласты подсчитывали с помощью гемоцитометра и разбавляли раствором ММg до плотности 1 млн протопластов на мл.

### **Трансфекция протопластов**

[146] Для трансфекции в пробирку объемом 2 мл (общий объем доводили до 20 мкл с помощью MilliQ) добавили 10 мкг раствора плазмидной ДНК (в 5 мМ Tris или MilliQ). 200 мкл суспензии протопластов добавили (еще не перемешанной) в каждую пробирку (используя наконечники с широким отверстием). После этого в первую пробирку добавили 200 мкл раствора ПЭГ (свежеприготовленного, см. выше) и тщательно перемешивали его, многократно переворачивая (до тех пор, пока смесь не стала однородной), прежде чем переходить к следующей пробирке. Смеси инкубировали в течение 10-20 минут (достаточно 10 минут, но при использовании нескольких образцов требуется больше времени). 500 мкл буфера W1 (0,5 М маннита, 20 мМ KCl и 4 мМ MES, pH 5,7) по каплям добавили к первому образцу, а затем тщательно перемешивали, прежде чем переходить к следующему образцу и т.д. После последнего образца этот шаг повторили, в результате ко всем образцам было добавлено в общей сложности 1 мл буфера W1. Пробирки центрифугировали при 200xg в течение 3 минут при комнатной температуре и осторожно удалили надосадочную жидкость при помощи пипетки. В каждую пробирку добавили еще 1 мл буфера W1 (как и на предыдущем этапе). Образцы снова центрифугировали и под конец протопласты ресуспендировали в 150 мкл буфера W1. Перед дальнейшим анализом протопласты инкубировали в течение 24 часов при 25°C (в темном помещении).

### **Проверка наличия случаев индуцированной инверсии**

[147] Для проверки на присутствие индуцированных мутаций, мы использовали целевые PCR, как показано на Фигуре 1B и C. Прямые и обратные праймеры были выполнены вокруг руководств MS и AA, с использованием референсного генома для последовательностей, фланкирующих locus гРНК, и программного обеспечения для разработки праймеров Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Пары праймеров представляют собой (AA-F) 5'-TGGTTGCTGCTCATCTTCAC -3'

(SEQ ID NO: 9) с (AA-R) 5'-GCAAAGCCACCTTCATTCAT-3' (SEQ ID NO: 10) и (MS-F) 5'-TAGGGGATTTTCATGCTGGT-3' (SEQ ID NO: 11) с (MS-R) 5'-GCCAAAATGAGTCCTTCCA-3' (SEQ ID NO: 12).

[148] Трансфицированные протопласты обрабатывали следующим образом: Для каждого образца 2 мкл выделенных протопластов разбавили в соотношении 1:1, используя 20 мМ КОН, 1% раствор казеина, затем кипятили в течение 5 минут и поместили на 5 минут на лед.

[149] «Левую» и «правую» стороны индуцированных инверсий амплифицировали при помощи ПЦР с использованием полимеразы Phire (производства Thermofisher). Для левого конца использовали прямой праймер MS (MS-F) и прямой праймер AA (AA-F), а для правого конца использовали обратный праймер MS-R и обратный праймер AA-R (рис. 1С). Реакционная смесь содержала 5 мкл 5-кратного буфера, 1 мкл 5 мМ дНТФ, 1,25 мкл 10 пмоль/мкл праймера F, 10 пмоль/мкл праймера R, 0,35 мкл полимеразы Phire, 4 мкл раствора протопластов (около 2700 протопластов) и 12,5 мкл воды. Также выполнялась проверка качества воды. Также для выявления редко возникающих событий было проведено 80 циклов ПЦР (10 сек при 98°C, 20 сек при 61,5°C и 40 сек время удлинения при 72°C). Для негативной регуляции использовали нетрансфицированные протопласты. Продукты ПЦР наносили на агарозный гель для их визуализации.

### **Количественная ПЦР**

[150] Чтобы оценить частоту событий инверсии, на обработанных образцах протопластов проводилась количественная ПЦР. Это делалось с помощью системы iQ SYBR Green Supermix (производства BioRad) на машине для количественной ПЦР (производства BioRad). Условия протекания реакции были следующие: 12,5 мкл iQ SYBR Green Supermix, 1,25 мкл 10 пмоль/мкл праймера F, 10 пмоль/мкл праймера R, 2 мкл раствора протопластов (около 1300 протопластов), вода до 25 мкл.

[151] В качестве ссылки был включен ген *Актина* из томата, с использованием в качестве прямых и обратных праймерных последовательностей 5'-ACTGTCCSTATCTATGAAGGTTATGC-3' (SEQ ID NO: 13) и 5'-GAAACAGACAGGACACTCGCACT-3' (SEQ ID NO: 14), соответственно.

### **Трансформация растения**

[152] Трансгенные растения (T0), содержащие CRISPR-Cas, получили путем трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*. Соответственно, может использоваться следующий метод преобразования. Семядоли 10-дневных проростков инкубируют в 8 мл клеток *Agrobacterium*, суспендированных в 2% MSO (жидкая среда MS, содержащая 100 мг л<sup>-1</sup> мио-инозитола, 400 мкг л<sup>-1</sup> тиамин HCl и 20 г л<sup>-1</sup> сахарозы) до ослабления 0,5 на 600 нм. Через 30 минут семядоли высушивают на стерильной фильтровальной бумаге и помещают на культуральную среду MS, содержащую 1× Nitsch и смесь витаминов Nitsch, 3% мас./об. сахарозы, 1 мг л<sup>-1</sup> N-ацетиласпартата, 1 мг л<sup>-1</sup> 6-бензиламинопурина и 0,7% мас./об. агара, pH 5,7. Через 2 дня совместного культивирования семядоли промывают в жидкой среде MS с 200 мг л<sup>-1</sup> карбенициллина и помещают в культуральную среду, индуцирующую побеги MS, содержащую 1× Nitsch и смесь витаминов Nitsch, 3% мас./об. сахарозы, 2 мг л<sup>-1</sup> зеатина, 200 мг л<sup>-1</sup> карбенициллина, 0,7% мас./об. агара, pH 5,7 и 100 мг л<sup>-1</sup> канамицина для отбора. Семядоли, которые начинают формировать каллус, помещают в свежую культуральную среду, содержащую половину концентрации зеатина и 1 мг л<sup>-1</sup> GA3. Семядоли помещают на свежую среду каждые 2 недели. После образования первоначальных каллусов зачатки побегов вырезают и переносят в культуральную среду MS для удлинения побегов, которая представляет собой среду для прорастания, содержащую 200 мг л<sup>-1</sup> карбенициллина и 100 мг л<sup>-1</sup> канамицина. Удлиненные побеги длиной 2-4 см вырезали из каллуса и поместили в культуральную среду MS для укоренения (1× Nitsch и смесь витаминов Nitsch, 1,5% мас./об. сахарозы, 5 мг л<sup>-1</sup> ИУК, 200 мг л<sup>-1</sup> карбенициллина, 50 мг л<sup>-1</sup> канамицина и 0,7% мас./об. агара, pH 5,7). Укоренившиеся (T0) проростки переносят в почву для дальнейшего анализа. Компоненты среды и антибиотики получают от компании Duchefa Biochemie.

### **Селекция трансгенного растения T0, содержащего активный конструкт CRISPR-Cas**

[153] Активность конструкта CRISPR-Cas зависит от места интеграции в геноме. Для идентификации растений T0 с активным конструктом растения, содержащие мутации, идентифицировали посредством секвенирования участков-мишеней в генах *MS* и *AA* в растениях T0. Эти домены амплифицировали при помощи ПЦР с использованием полимеразы Phire (производства Thermofisher). Использовали

набор праймеров, специфичных для участка-мишени в *MS* или для генов *AA*. Реакционная смесь содержала 5 мкл 5-кратного буфера, 1 мкл 5 мМ дНТФ, 1,25 мкл 10 пмоль/мкл прямого праймера, 10 пмоль/мкл обратного праймера, 0,35 мкл полимеразы Phire, 4 мкл раствора геномной ДНК (4 нг) и 12,5 мкл воды. Для амплификации участков-мишеней провели тридцать циклов ПЦР (10 с при 98°C, 20 с при 60°C и время удлинения 5 с при 72°C). Продукты ПЦР секвенировались поставщиком услуг, а наличие мутаций определяли с помощью компьютерной программы для анализа последовательности ДНК.

**Самоопыление и скрещивание растений T0 с растениями, не содержащими указанную экзогенную ДНК, для получения множества растений-потомков**

[154] Выращивали отобранные растения T0 с активной конструкцией CRISPR-Cas, после чего цветам давали самоопылиться для получения плодов с семенами T1. Плоды выращивали, затем собирали семена T1.

[155] В качестве альтернативы выращивали отобранные растения T0 с активным конструктом CRISPR-Cas, а цветки подвергали кастрированию перед расхождением пыльников, чтобы предотвратить самоопыление. Выделенную из растения дикого типа пыльцу собирали и использовали для опыления отобранных растений T0, затем выращивали плоды и собирали семена F1. Для получения семян F2 можно выращивать растения F1, содержащие активный конструкт CRISPR-Cas.

[156] Проращивали семена T1, F1 и F2 и из первых листьев выделяли геномную ДНК. Были разработаны ПЦР для обнаружения желаемых мутаций, случаев инверсии или других структурных вариаций. Используя стратегию объединения в группы (например, Tsai et al., 2011; <https://doi.org/10.1104/pp.110.169748>) можно проанализировать большое количество проростков с помощью совсем небольшого количества ПЦР.

**ПРИМЕР 2**

[157] Конструировали конструкт CRISPR-Cas9 в соответствии с описанием в Примере 1. Было создано три конструкта CRISPR-Cas9, в которых была объединена одна гРНК для *AA* и одна для *MS*. Конструкт 1 содержал gMS1 и gAA1, в Конструкте 3 содержались gMS2 и gAA2, а в конструкте 4 gMS4 и gAA4.

**Таблица 2. Сайты-мишени гРНК для создания двухцепочечных разрывов ДНК в гене мужской стерильности *MS* и гене отсутствия антоциана *AA*, оба на *Ch02* томата. Знак ↓ ставится в том месте, где ожидается разрыв двухцепочечной цепи. Сайт РАМ выделен курсивом.**

Целевой ген	название	гРНК	Положение SL3.0ch02*
<i>MS</i>	gMS1	GGCGTCAAAA <b>ACTTAGC</b> ↓GAA <i>AGG</i> (SEQ ID NO: 5)	44796509-44796487
<i>MS</i>	gMS3	AACTCTGAAGAAAGGGA↓AGT <i>AGG</i> (SEQ ID NO: 15)	44796612-44796590
<i>MS</i>	gMS4	ATTCAAACA <b>ACTCTGAA</b> ↓GAA <i>AGG</i> (SEQ ID NO: 16)	44796620-44796598
<i>AA</i>	gAA1	GAAAGTGTATGGTTCAG↓CAA <i>TGG</i> (SEQ ID NO: 7)	45896370-45896392
<i>AA</i>	gAA3	AATGGCTGCATGTCCAC↓AAA <i>GGG</i> (SEQ ID NO: 17)	45896388-45896410
<i>AA</i>	gAA4	ATGGTTTGTCTTATAGA↓ATT <i>GGG</i> (SEQ ID NO: 18)	45896413-45896435
* <i>Solanum lycopersicum</i> сорт Heinz 1706 хромосома 2, SL3.0.			

[158] Конструкты размножали в *Escherichia coli*, выделяли и очищали плазмиды, после чего их очищали для трансфекции протопластов томата. Из выращенных *in vitro* листьев растения сорта «Moneymaker» выделяли протопласты. После трансфекции и инкубации по клеточным культурам с помощью ПЦР проводился скрининг на наличие случаев инверсии. Для этого часть трансфицированных протопластов (около 2700 клеток) перенесли в пробирку для ПЦР и денатурировали в КОН в соответствии с описанием в Примере 1.

[159] ПЦР проводили на клеточном лизате с использованием в отдельных ПЦР пар комбинаций праймеров AA-F с MS-F или AA-R с MS-R. Используется одинаковая цепь отжига одной пары праймеров, что позволяет предотвратить амплификацию на ДНК дикого типа и производить ее только в случае индуцирования инверсии (рис. 2). Кроме того, расстояние между праймерами одной пары составляет около

1,1 млн п.о. в геноме дикого типа, что слишком много для амплификации продукта ПЦР.

**Таблица 3. Праймеры ПЦР, используемые для амплификации границ инверсии**

Название праймера	Последовательность праймера	Положение SL3.0ch02*
AA-F	5'-TGGTTGCTGCTCATCTTCAC -3' (SEQ ID NO: 9)	43326933-43326952
MS-F	5'-TAGGGGATTTTCATGCTGGT-3' (SEQ ID NO: 11)	42223166-42223185
AA-R	5'-GCCAAGCCACCTTCATTCAT-3' (SEQ ID NO: 10)	43328249-43328230
MS-R	5'-GCCAAAAATGAGTCCTTCCA-3' (SEQ ID NO: 12)	42224500-42224481
* <i>Solanum lycopersicum</i> сорт Heinz 1706 хромосома 2, SL3.0.		

[160] Однако при этом инверсия области между мишенями гРНК сблизит сайты праймеров в ориентации, за счет чего возможной станет амплификация продукта ПЦР, включая границу инверсии, как показано на Фигуре 2.

[161] Продукты ПЦР из протопластов, трансфицированных конструктами 1, 3 и 4, отделили на агарозном геле, вырезали из геля фрагменты ожидаемого размера и выполнили в отношении ДНК секвенирование по Сэнгеру. Неожиданно в большинстве ПЦР формировались фрагменты ДНК ожидаемого размера, что должно указывать на то, что случаи инверсии происходят в одном или нескольких протопластах за реакцию. Учитывая, что в одной реакции используются ДНК примерно из 2700 протопластов, а эффективность трансфекции составляет около 70% (судя по флуоресценции гена *GFP*, также присутствующего в конструктах; данные не показаны), это означает, что частота инверсии  $> 1/(0,7*2700)$  клеток. Ожидаемые размеры ампликонов ПЦР зависели от расположения праймеров и сайтов связывания гРНК в геноме, что составляет около 1,3 тыс. п.о. Расположение сайтов связывания праймеров и гРНК и их последовательности показаны в таблицах 2 и 3.

[162] На Фигуре 3 показана часть последовательности ДНК продукта ПЦР, сформированная с помощью праймеров MS-R и AA-R, и геномная ДНК из культуры протопластов, трансфицированных конструктом 1, содержащим гРНК gMS1 и gAA1. Последовательность начинается с нижнего правого конца инверсии. Выравнивание в нижней части фигуры показывает, что ДНК была расщеплена в

сайте связывания gMS1, а расположенная выше часть была связана с сайтом связывания gAA1. Очевидно, энзим Cas сформировал двухцепочечные разрывы (DSB) в обоих сайтах связывания гРНК, что привело к инверсии фрагмента хромосомы с расстоянием около 1,1 млн п.о. между ними. Разрывы двухцепочечной ДНК были сформированы в точно предсказанных местах в сайтах связывания гРНК, которые находятся между тремя и четырьмя парами оснований в точке до сайта PAM. Лигирование концов инвертированного фрагмента хромосомы проводили без дополнительной модификации последовательности.

[163] На Фигуре 4 показана часть последовательности ДНК продукта ПЦР, сформированной с помощью праймеров MS-F и AA-F, и геномной ДНК из протопластов, трансфицированных конструктом 3. Последовательность начинается с верхнего левого конца инверсии. Выравнивание в нижней части фигуры показывает, что ДНК была расщеплена в сайте связывания gMS3, а расположенная выше часть была связана с сайтом связывания gAA3.

[164] Энзим Cas9 также сформировал здесь двухцепочечные разрывы (DSB) в обоих сайтах связывания гРНК, что привело к инверсии фрагмента хромосомы с расстоянием около 1,1 млн п.о. между ними. DSB были созданы точно в предсказанных местах в сайтах связывания гРНК, а лигирование концов инвертированного фрагмента хромосомы проводили без дополнительной модификации последовательности.

[165] На Фигуре 5 показана часть последовательности ДНК продукта ПЦР, сформированной с помощью праймеров MS-R и AA-R, и геномной ДНК из протопластов, трансфицированных конструктом 4. Последовательность начинается с нижнего правого конца инверсии. Выравнивание в нижней части фигуры показывает, что ДНК была расщеплена в месте расположения gMS4, и была связана с сайтом связывания в месте расположения gAA4. Энзим Cas также генерировал здесь разрыв двухцепочечной ДНК с обеих сторон индуцированной инверсии точно в предсказанном месте в сайтах связывания гРНК, и лигирование концов было выполнено с применением делеции одного аденозина в сайте лигирования.

[166] Три последовательности на фигурах 3-5 показывают, что гРНК направляют Cas9 в предсказанные позиции, и что расщепление ДНК происходит в ожидаемой

позиции. Кроме того, секвенированные переходы демонстрируют, что разрывы двухцепочечной ДНК были сформированы в двух местах на хромосоме и что в некоторых случаях фрагмент хромосомы между ними был инвертирован после репарации. Последовательности лигированных концов (переход) демонстрируют, что разрывы двухцепочечной ДНК генерировались в предсказанных положениях.

[167] Соответственно пример 2 показывает, что случаи инверсии можно обнаружить путем амплификации границ инверсии в большинстве ПЦР, содержащих ДНК из около 2700 протопластов. Как объяснялось выше по тексту документа, это означает, что инверсия происходит примерно в 1 из  $2700 \cdot 0,7$  (примерная эффективность трансфекции) = около 1900 протопластов. Чтобы получить растение с желаемой мутацией, потребуется большое количество ( $> 1900$ ) регенерированных побегов, чтобы иметь вероятность найти желаемую мутацию в растении. У многих видов, включая томат, регенерация побегов из протопластов технически очень сложна, а у некоторых видов такая регенерация никогда успешно не проходила.

[168] Для решения этой технической проблемы настоящее изобретение предоставляет подход к скринингу для выявления такой мутации на основе семян. В целом, конструкт CRISPR-Cas приводит к возникновению двухцепочечных разрывов в ДНК, которые в большинстве случаев репарируются. Система репарации зачастую модифицирует сайт связывания гидовой РНК (гРНК), а это означает, что после репарации сайт связывания гРНК исчезает и новые двухцепочечные разрывы не образуются. Тем не менее, при скрещивании растения, содержащего активный конструкт CRISPR-Cas, с растением дикого типа, по меньшей мере, половина полученных семян будет содержать активный конструкт CRISPR-Cas в дополнение к ДНК дикого типа с немодифицированными сайтами связывания гРНК. Это означает, что каждое отдельное семя такого растения представляет собой вероятную возможность вызвать и идентифицировать редко встречающееся мутационное событие. Таким образом, если событие, т.е. инверсия, происходит в 1 на 1900 событий, то можно провести скрининг множественности этого количества проростков, чтобы выявить желаемую мутацию. Скрининг может выполняться в виде ПЦР со специфическими для границ праймерами, как описано выше для протопластов. Чтобы уменьшить количество отдельных ПЦР, можно разработать одно-, двух- или трехмерную стратегию объединения.

[169] Таким образом, описанный в настоящем документе способ впервые позволяет получить растения томата, обладающие одновременно тремя желательными признаками:

1. Инактивация *MS*, приводящая к мужской стерильности у гомозиготных растений, что способствует получению гибридных семян;
2. Инактивация *AA*, приводящая к отсутствию антоцианов и, следовательно, к потере пурпурной окраски гипокотыля;
3. Генетическая связь этих двух признаков из-за подавления рекомбинаций в мейозе между мутантными аллелями *ms* и *aa*, вызванного инверсией, и, следовательно, потерей гомологии последовательности между двумя генами.

## Формула изобретения

1. Растение видов *Solanum lycopersicum*, содержащее в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена мужской стерильности 10 (*MS10*) дикого типа и мутантный аллель гена отсутствия антоциана (*AA*) дикого типа, причем в указанном растении частота рекомбинаций в мейозе снижается между указанным мутантным аллелем гена *MS10* дикого типа и указанным мутантным аллелем гена *AA* дикого типа по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа,

причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, и мутантный аллель гена *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и

причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, и мутантный аллель гена *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа.

2. Растение по п. 1, **отличающееся тем**, что растение является гомозиготным для мутантного аллеля гена мужской стерильности 10 (*MS10*) дикого типа и гомозиготным для мутантного аллеля гена отсутствия антоциана (*AA*) дикого типа.

3. Растение по п. 1 или 2, **отличающееся тем**, что мутантный аллель мужского гена *MS10* (мутантный аллель *MS10*) дикого типа, когда присутствует в гомозиготной форме, индуцирует мужскую стерильность.

4. Растение по любому из предшествующих пунктов, **отличающееся тем**, что мутантный аллель гена *AA* дикого типа (мутантный аллель *AA*), когда

присутствует в гомозиготной форме, индуцирует отсутствие антоциана в гипокотилиях.

5. Растение по любому из предшествующих пунктов, **отличающееся тем**, что хромосома, содержащая мутантный аллель гена мужской стерильности 10 (мутантный аллель *MS10*) дикого типа и мутантный аллель гена отсутствия антоциана (мутантный аллель *AA*) дикого типа включает инверсию и/или делецию в геномной области между указанным мутантным аллелем *MS10* и указанным мутантным аллелем *AA*.

6. Растение по любому из предшествующих пунктов, **отличающееся тем**, что пониженная частота рекомбинаций в мейозе соответствует генетической дистанции между мутантным аллелем *MS10* и мутантным аллелем *AA* менее 6 сМ.

7. Растение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что растение является инбредным растением, дигамплоидным растением или гибридным растением.

8. Семя, из которого может быть выращено растение по любому из предшествующих пунктов.

9. Часть растения по любому из пп. 1-7, **отличающаяся тем**, что указанная часть растения предпочтительно представляет собой лист, пыльник, пестик, стебель, черешок, корень, семяпочку, пыльцу, микроспору, протопласт, каллус, ткань, семя, цветок, семядолю, гипокотиль, зародыш или клетку.

10. Способ выявления и/или выбора растения с мужской стерильностью, при этом указанный способ включает выращивание растения по любому из пп. 1-7 и определение того, отсутствует ли антоциан в гипокотилиях указанного растения.

11. Способ выявления и/или выбора растения или части растения видов *Solanum lycopersicum*, содержащего в своем геноме, по меньшей мере, одну хромосому, содержащую мутантный аллель гена *MS10* дикого типа и мутантный аллель гена *AA* дикого типа,

причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, и мутантный аллель гена *MS10* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или

сниженной экспрессии гена дикого типа, и/или мутантный аллель гена *MS10* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и

причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3, и мутантный аллель гена *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или сниженной экспрессии гена дикого типа и/или мутантный аллель гена *AA* дикого типа кодирует белок с потерей функции или снижением функции по сравнению с белком дикого типа, и

причем указанный способ включает определение того, был ли модифицирован участок геномной ДНК между геном *MS10* и геном *AA*, в результате чего частота рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* снижается по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа.

12. Способ по п. 11, **отличающийся тем**, что растение или часть растения подвергают этапу, на котором индуцируется двухцепочечный разрыв в гене *MS10* дикого типа или рядом с ним для получения мутантного аллеля гена *MS10* дикого типа, и/или двухцепочечный разрыв индуцируется в гене *AA* дикого типа или рядом с ним для получения мутантного аллеля гена *AA* дикого типа до определения того, был ли модифицирован участок геномной ДНК между геном *MS10* и геном *AA*, в результате чего частота рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* снижается по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа.

13. Способ производства растения или части растения видов *Solanum lycopersicum* с мужской стерильностью и гипокотильями с отсутствием антоциана, причем в указанном растении или части растения частота рекомбинаций в мейозе между свойством мужской стерильности и свойством гипокотилей с отсутствием антоциана снижается по сравнению с частотой рекомбинаций в мейозе между геном *MS10* и геном *AA* в растении *Solanum lycopersicum* дикого типа, при этом указанный способ включает:

- (a) индуцирование в растение или часть растения двухцепочечного разрыва как в гене *MS10*, так и гене *AA*,

причем ген *MS10* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 и

причем ген *AA* дикого типа кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 3;

- (b) при необходимости, регенерацию части растения, в которой двухцепочечный разрыв индуцируется в растение или различную часть растения.

14. Способ по п. 13, **отличающийся тем**, что двухцепочечный разрыв как в гене *MS10*, так и в гене *AA* индуцирует инверсию и/или делецию фрагмента геномной ДНК, расположенного между двухцепочечными разрывами.

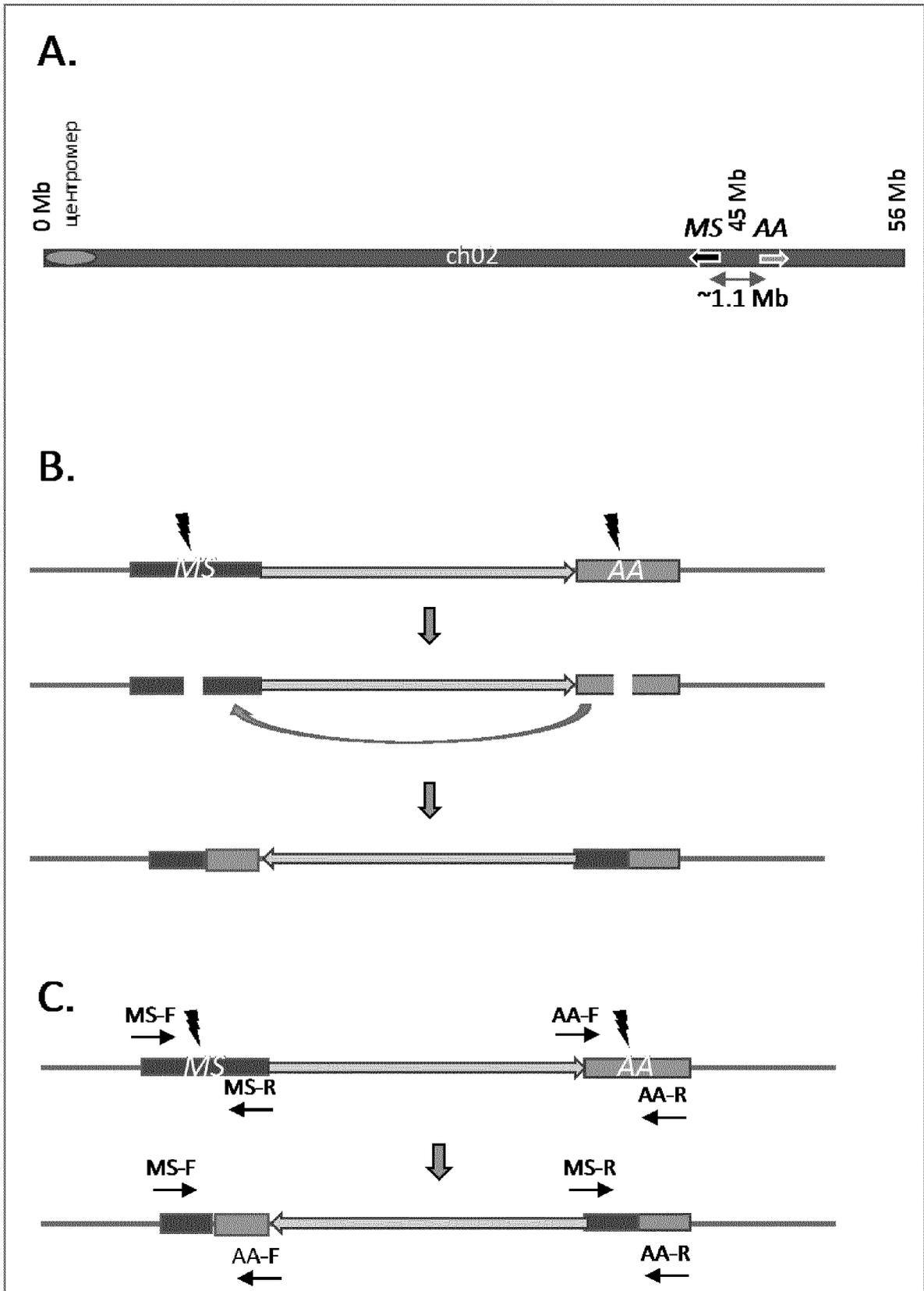
15. Способ по п. 13 или 14, **отличающийся тем**, что двухцепочечный разрыв индуцируется в протопласте, каллусе или микроспоре.

16. Способ по любому из пп. 13 - 15, **отличающийся тем**, что двухцепочечный разрыв, индуцированный в ген *MS10* дикого типа, приводит к отсутствию экспрессии или снижению экспрессии гена *MS10* и/или к потере функции или снижению функции белка, кодированного указанным геном *MS10*; и/или

двухцепочечный разрыв, индуцированный в ген *AA* дикого типа приводит к отсутствию экспрессии или снижению экспрессии гена *AA* и/или к потере функции или снижению функции белка, кодированного указанным геном *AA*.

17. Способ по любому из пп. 13 - 16, **отличающийся тем**, что двухцепочечный разрыв индуцируется с использованием сконструированной эндонуклеазы, причем указанная сконструированная эндонуклеаза предпочтительно представляет собой мегануклеазу, нуклеазу цинкового пальца (ZFN), нуклеазу на основе эффектора, подобную активатору транскрипции (TALEN), или нуклеазу, ассоциированную с кластеризованными регулярными интервалами коротких палиндромных повторов (CRISPR).

Фигура 1.



Фигура 2.

