



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.22

(21) Номер заявки
202290032

(22) Дата подачи заявки
2020.06.10

(51) Int. Cl. *A01H 5/08* (2018.01)
A01H 6/82 (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) РАСТЕНИЕ ТОМАТА, ПРОИЗВОДЯЩЕЕ ПЛОДЫ С УЛУЧШЕННЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ СОЗРЕВАНИЯ

(31) 19180086.1

(32) 2019.06.13

(33) EP

(43) 2022.05.04

(86) PCT/EP2020/066040

(87) WO 2020/249593 2020.12.17

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

(72) Изобретатель:
Вризен Вим, Весселинк Питер (NL)

(74) Представитель:
Беляева Е.Н. (BY)

(56) AKIRA NAKATSUKA ET AL.: "Differential Expression and Internal Feedback Regulation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase, and Ethylene Receptor Genes in Tomato Fruit during Development and Ripening", PLANT PHYSIOLOGY, vol. 118, no. 4, 1 December 1998 (1998-12-01), pages 1295-1305, XP055634714, Rockville, Md, USA, ISSN: 0032-0889, DOI: 10.1104/pp.118.4.1295, cited in the application, abstract; Figures 1 and 4

AI-SHENG XIONG ET AL.: "Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato", PLANT CELL REPORTS, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 23, no. 9, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 639-646, XP019335426, ISSN: 1432-203X, DOI: 10.1007/S00299-004-0887-7, abstract; pages 639, 640, 645; Figure 1

B. VAN DE POEL ET AL.: "Targeted Systems Biology Profiling of Tomato Fruit Reveals Coordination of the Yang Cycle and a Distinct Regulation of Ethylene Biosynthesis during Postclimacteric Ripening", PLANT PHYSIOLOGY, vol. 160, no. 3, 13 September 2012 (2012-09-13), pages 1498-1514, XP055525641, Rockville, Md, USA, ISSN: 0032-0889, DOI: 10.1104/pp.112.206086, cited in the application, abstract; pages 1500-1504; Figure 6

CORNELIUS S. BARRY ET AL.: "Ethylene and Fruit Ripening", JOURNAL OF PLANT GROWTH REGULATION, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 26, no. 2, 6 June 2007 (2007-06-06), pages 143-159, XP019540628, ISSN: 1435-8107, DOI: 10.1007/S00344-007-9002-Y, abstract; pages 145, 154, 155

WO-A1-2018220581
WO-A1-9101375

(57) Изобретение относится к растению вида *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена ACO4 дикого типа, причем указанный мутантный аллель, при его присутствии в гомозиготной форме, приводит к получению плодов, обладающих повышенной твердостью плода после вступления плодов в стадию полностью красной окраски. Изобретение также относится к семеню, из которого может быть выращено растение по настоящему изобретению, к растению, выращенному из семени по настоящему изобретению, к плоду, произведенному растением по настоящему изобретению, и к части растения по настоящему изобретению. Изобретение также относится к способу производства плодов томата с увеличенным сроком хранения, включающему выращивание растения по настоящему изобретению. Изобретение также относится к способу идентификации и/или отбора растения или части растения по настоящему изобретению. Изобретение также относится к способу производства растения вида *Solanum lycopersicum*, содержащего в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена ACO4 по настоящему изобретению. Изобретение также относится к применению растения вида *Solanum lycopersicum* по настоящему изобретению для его потребления или в качестве источника материала для размножения.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области разведения растений. В частности, к растению вида *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена ACO4 дикого типа, причем указанный мутантный аллель, при его нахождении в гомозиготной форме, приводит к получению плодов, обладающих повышенной твердостью после вступления плода в стадию полностью красной окраски. Изобретение также относится к семеню, из которого может быть выращено растение по настоящему изобретению, к растению, выращенному из семени по настоящему изобретению, к плоду, произведенному растением по настоящему изобретению, и к части растения по настоящему изобретению. Изобретение также относится к способу производства плодов томата с увеличенным сроком хранения, включающему выращивание растения по настоящему изобретению. Изобретение также относится к способу идентификации и/или отбора растения или части растения по настоящему изобретению. Изобретение также относится к способу производства растения вида *Solanum lycopersicum*, содержащего в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена ACO4 по настоящему изобретению. Изобретение также относится к применению растения вида *Solanum lycopersicum* по настоящему изобретению для его потребления или в качестве источника материала для размножения.

Предпосылки к созданию изобретения

Разведение растений вида *Solanum lycopersicum* направлено на производство товарных сортов, оптимально приспособленных к условиям хранения и выращивания. Задача, которую приходится решать селекционерам, заключается в поиске улучшенного баланса между твердостью плода после его сбора и предпочтениями потребителей относительно вкуса, текстуры и цвета. Эти предпочтения потребителей тесно связаны с созреванием плода. Созревание плода - это сложный процесс развития, который отвечает за трансформацию органа, содержащего семя, в приемлемую для семени ткань.

Изменения, связанные с созреванием плода, в частности повышение степени мягкости после его сбора, ограничивают срок хранения свежих томатов.

Для роста и развития плода томата различают ряд последовательных фаз. После развития цветка (первая фаза) и опыления (вторая фаза) происходит раннее развитие плода (третья фаза), которое характеризуется большой частотой деления клеток, после чего плод резко увеличивается в размере в основном благодаря росту клеток. В конце третьей фазы плод достигает стадии спелости с зеленовато-бурой окраской (четвертая фаза). В ходе четвертой фазы происходит созревание плода, которое характеризуется изменением цвета и вкуса, а также твердости и текстуры плода.

Формирование характерного красного цвета плода томата вызвано накоплением ликопена и каротина. В целом, в ходе процесса развития томата различают разные фазы окрашивания: зрелость с зеленовато-бурой окраской, стадия бланжевой спелости, стадия оранжевой и полностью красной окраски. На стадии бланжевой спелости начинается стандартная красная пигментация. На стадии полностью красной окраски плод достигает зрелого цвета на большей части своей поверхности.

Помимо изменения цвета во время созревания плода ферментативная активность приводит к разложению средней пластинчатой области клеточных оболочек, в результате чего происходит разрыхление клетки, что проявляется в форме смягчения плода и утраты им текстуры. Смягчение плода зачастую измеряют пределом прочности на внешнее сжатие, который можно рассчитать с использованием, например, пенетрометра.

Созреванию и старению климактерических плодов, таких как томаты, способствует этилен. Для использования в климактерических растениях были предложены две системы, регулирующие выработку этилена. Первая система работает во время обычного вегетативного роста. Система 1 является самоингибиторной и отвечает за выработку базовых уровней этилена, которые обнаруживаются во всех тканях, включая ткани неклимактерических растений. Система 1 продолжает работать в ходе развития плода до тех пор, пока не будет приобретена способность к его созреванию. Затем достигается период перехода, который характеризуется увеличением уровня этилена. Этот повышенный уровень этилена вводит в действие систему 2, которая активна во время созревания климактерического плода. В системе 2 выработка этилена носит автокаталитический характер.

Этилен является автокаталитическим из-за собственного биосинтеза за счет увеличения активности 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (ACC), синтазы (ACS) и оксидазы ACC (ACO). Биосинтез этилена описан, например, в документе Stearns and Glick (*Biotechnology Advances (Прорывы в биотехнологии)* 2003, том 21, с. 193-210), который включен в текст настоящего документа посредством ссылки.

Синтаза ACC (ACS) - это фермент, который катализирует синтез 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (ACC) из S-аденозилметионина. Под ACS также понимают 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатсинтазу, Le-ACS, или S-аденозил-L-метионин метилтиоаденозинлиазу. По меньшей мере восемь генов ACS (LeACS1A, LeACS1B и LeACS2-7) были выявлены в томате (Alexander et al. (2002), *Journal of Experimental Botany*, том 53, № 377, с. 2039-2055), и у каждого из генов ACS разный профиль экспрессии.

Оксидаза ACC (ACO) - это фермент, который катализирует конверсию ACC в этилен. Также под ACO понимают 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатоксидазу, Le-ACO или этиленобразующий фермент. В томате было выявлено по меньшей мере пять генов ACO (LeACO1-5), которые по-разному экспресси-

руются во время развития и созревания плода (Van de Poel et al. (2013), *Plant Physiology*, 160:1498-1514). Во время действия системы 1 происходит экспрессия АСО1, АСО2 и АСО4. На переходном периоде АСО3 экспрессируется кратковременно. Во время действия системы 2, в частности, резко увеличивается экспрессия АСО1 и АСО5, которая достигает максимального уровня на стадии оранжевой окраски. На повышенных уровнях на постклимактерической стадии созревания плода продолжает экспрессироваться только АСО1, см., например, фиг. 12 из документа Van de Poel et al. (в ранее цитированной части). Единственное мнение относительно уровня АСО4 во время созревания и старения плодов томата отсутствует. В документе Van de Poel et al. (в ранее цитированной части) сообщается, что экспрессия АСО4 происходит на крайне низком уровне во время созревания плода и в период хранения после его сбора, тогда как в других документах упоминалось о повышенной или устойчивой экспрессии АСО4 в период созревания плодов томата (Jafari et al. (2013), *Molecular Biology Reports*, 40:1341-1350; Nakatsuka et al. (1998), *Plant Physiology*, 118:1295-1305). Таким образом, точная роль каждой отдельной изоформы АСО и, в частности, АСО4 в процессе созревания плодов томата и их старения не известна. В любом случае большое количество различных изоформ АСО в томате указывает на относительно высокую экспрессию гена во время созревания плода в сочетании с высокой избыточностью в разных изоформах АСО томата.

Модификация отдельных генов, которая, как известно, принимает участие в созревании, пока что не привела к изменению плода томата с нормальным процессом созревания и особенно плода нормального цвета, однако при этом во время созревания и старения плода имеет место минимальное смягчение тканей. В связи с этим появляется потребность в культивируемых растениях томата с модифицированным уровнем выработки этилена, в которых отмечается нормальное развитие и созревание плода, особенно нормальное развитие его цвета в сочетании с улучшенным развитием твердости плода во время его созревания и старения и/или с увеличенным сроком хранения плодов томата по сравнению с плодами, которые производятся растениями томата дикого типа.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к растению вида *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа, и/или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1.

Изобретение также относится к семени, из которого может быть выращено растение по настоящему изобретению, к растению, выращенному из указанного семени, к плоду, произведенному растением 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, протопласт, ткань, семя, цветок, семядолю, гипокотиль, зародыш или клетку.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу производства плодов томата с увеличенным сроком хранения, причем указанный способ включает выращивание растения по настоящему изобретению и сбор плодов, произведенных указанными растениями. Настоящее изобретение также относится к способу идентификации или отбора растения или части растения вида *Solanum lycopersicum*, содержащих мутантный аллель гена АСО4 дикого типа, включающему определение того, содержит ли растение или часть растения мутантный аллель гена АСО4, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и, при необходимости, отбор растения или части растения, содержащих по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. Настоящее изобретение также относится к способу создания растения вида *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 согласно определению в настоящем документе, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и при этом указанный способ включает шаг(и): (i) скрещивание первого растения *Solanum lycopersicum* и второго растения, причем первое растение *Solanum lycopersicum* представляет собой растение по настоящему изобретению; (ii) при необходимости, сбор семян растения, полученного скрещиванием по пункту (i), и отбор семян, содержащих в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 в соответствии с описанием в настоящем документе.

Также настоящее изобретение относится к применению растения по настоящему изобретению, предпочтительно содержащего мутантный аллель асо4 в гомозиготной форме, в качестве культуры для получения плодов с целью их потребления. Изобретение также относится к применению растения по настоящему изобретению в качестве источника материала для размножения.

Краткое описание перечня последовательностей

SEQ ID NO: 1 показывает аминокислотную последовательность белка ACO4 Solanum lycopersicum дикого типа.

SEQ ID NO: 2 показывает нуклеотидную последовательность (кодирующую ДНК или к ДНК), кодирующую белок ACO4 Solanum lycopersicum дикого типа.

SEQ ID NO: 3 показывает аминокислотную последовательность мутантного белка aso4 Solanum lycopersicum.

SEQ ID NO: 4 показывает нуклеотидную последовательность (кодирующую ДНК или кДНК), кодирующую мутантный белок aso4 Solanum lycopersicum.

Краткое описание схем

Фиг. 1: Сравнение твердости плода с течением времени в растениях с мутантным aso4 (растения aso4/aso4) и незиготических растений (растений ACO4/ACO4). Плоды измерили в день приобретения ими полностью красной окраски (0 дней после приобретения полностью красной окраски) или через 7, 14 или 21 день после приобретения полностью красной окраски. Белые полосы обозначают твердость незиготического плода (n=16), а заштрихованные полосы относятся к твердости плода с мутантным aso4 (n=24) в ньютонах (Н) на миллиметр (мм). Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение. * Параметрический t-критерий Стьюдента $P < 0,05$.

Фиг. 2: Сравнение размера плодов мутантных и незиготических растений. Размер плода измеряют на момент достижения им полностью красной окраски. Поперечный диаметр плодов незиготических растений (n=64) и растений с мутантным aso4 (n=96), мм. Размер плода незиготических растений и растений с мутантным aso4 отличается незначительно (параметрический t-критерий Стьюдента $P = 0,84$). Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку.

Фиг. 3: Сравнение времени созревания (в днях между стадией бланжевой спелости (СБС) и стадией полностью красной окраски) плодов мутантных и незиготических растений. Эти два генотипа не отличаются по времени между стадией бланжевой спелости и стадией полностью красной окраски (параметрический t-критерий Стьюдента $P = 0,35$). Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку.

Подробное описание изобретения

Общие определения.

Термин "геном" относится к генетическому материалу организма. Он состоит из ДНК. Геном включает и гены, и некодирующие последовательности ДНК.

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 генетический детерминант содержит один ген.

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.

В тексте настоящего документа слово "свойство" относится к фенотипу растения. Если растение демонстрирует свойства данного изобретения, его геном содержит мутантный аллель, обеспечивающий появление свойства по изобретению, в частности, в настоящем изобретении, если мутантный аллель находится в гомозиготной форме. Таким образом, у растения имеется генетический детерминант изобретения. Очевидно, что при упоминании в тексте растения, содержащего свойство растения по изобретению, имеется в виду растение вида Solanum lycopersicum, имеющее свойство повышенной твердости плодов согласно описанию далее по тексту настоящего документа.

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 генетический детерминант содержит один рецессивный ген.

Отбор по генетическому детерминанту (например, мутантный аллель aso4) 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 используют 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 с копиями гена АСО4 дикого типа (гомозиготные по мутантному аллелю асо4), гетерозиготными растениями или семенами и гомозиготными растениями или семенами, не имеющими копий мутантного гена асо4 по настоящему изобретению, что может выполняться даже до прорастания семян или на раннем этапе развития растения, например до развития зрелых плодов.

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.

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).

Термин "локус" (мн. локусы) означает определенное место или места или участок на хромосоме, где находится, например, ген или генетический маркер. Таким образом, локусом (или локусами) плода с повышенной твердостью по настоящему изобретению является место(а) в геноме растения *Solanum lycopersicum*, где имеется ген АСО4.

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" геной 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 длинной 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. АТГ) белка, кодированного этим геном.

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".

"Экспрессия гена" означает процесс, в котором ДНК участок, функционально связанный с соответствующими регуляторными участками, в частности промотором, транскрибируется в РНК, которая является биологически активной, т.е. способна быть переведенной в биологически активный белок или пептид (или активный фрагмент пептида) либо быть активной (например, в посттранскрипционном сайленсинге генов или РНК-интерференции). Кодирующая последовательность может быть в смысловой ориентации и кодирует желаемый биологически активный белок или пептид или активный фрагмент пептида.

"Локус количественных признаков" или "ЛКП" - это хромосомный локус, который кодирует один или несколько аллелей, негативно влияющих на экспрессивность непрерывно распределенного (количественного) фенотипа.

"Физическое расстояние" между локусами (например, 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 (Мб) или миллионах пар оснований (млн п.о.).

"Генетическое расстояние" между локусами (например, между молекулярными маркерами и/или между фенотипическими маркерами) на той же хромосоме измеряют частотой событий кроссинговера или рекомбинантной частотой (РЧ) и указывают в сантиморганах (сМ). Один сМ соответствует рекомби-

нантной 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.

"Аллель дикого типа" (АДТ) относится в настоящем документе к версии гена, кодирующего функциональный белок (дикий тип белка). Соответственно, термин "аллель АСО4 дикого типа", или "аллель АСО4", или "аллель дикого типа гена АСО4" относится к полностью функциональному аллелю гена АСО4, который обеспечивает нормальное функционирование белка (т.е. нормальную экспрессию белка в сочетании с нормальной ферментативной активностью экспрессированного белка) по сравнению с аллелем АСО4 дикого типа. Вся аминокислотная последовательность белка АСО4 дикого типа сохраняется в виде диоксигеназы. Один домен белка АСО4 дикого типа является специфичным для 2-оксоглутарата, а еще один белковый домен - для суперсемейства оксигеназы с зависимостью от Fe(II). Считается, что эти домены имеют важное значение для активности белка в условиях *in vivo*. Так, одним из примеров аллеля АСО4 дикого типа в растениях, относящихся к виду *Solanum lycopersicum*, является геномная ДНК дикого типа, которая кодирует последовательность кДНК АСО4 дикого типа (мРНК), показанную в SEQ ID NO: 2. В белковой последовательности, которая кодируется этой кДНК АСО4 дикого типа, имеется 316 аминокислотных радикалов, и она показана в SEQ ID NO: 1, что соответствует эталонной последовательности NP_001233928.1 Национального центра биотехнологической информации. Аллель АСО4 *Solanum lycopersicum* дикого типа также содержит функциональные варианты геномной ДНК дикого типа, которая кодирует аминокислотные последовательности к ДНК АСО4 дикого типа и аминокислотные последовательности, описание которых приводится в настоящем документе. Чтобы определить, является ли какой-то конкретный вариант аллеля АСО4 дикого типа, отдельно описанный в настоящем документе, "функциональным вариантом", можно использовать стандартные методы, включая, помимо прочего, проверку ферментативной активности белка, фенотипическое тестирование на нормальное созревание плодов 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/. 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, 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. Также функциональным вариантом аллеля АСО4 дикого типа может быть ортолог гена АСО4 *Solanum lycopersicum*, особенно у дикой родственной формы вида *Solanum lycopersicum*, но при этом указанный вариант должен обеспечивать нормальную функцию белка.

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 получают 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 компартментов, 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 белок с мутацией в домене, зависимой от Fe(II) оксигеназы, в результате чего в мутированном белке функция будет ослаблена или отсутствовать по сравнению с белком дикого типа. Более предпочтительно мутантный аллель по настоящему изобретению кодирует белок с терминирующей мутацией в домене зависимой от Fe(II) оксигеназы, в результате чего в укороченном белке функция будет ослаблена или отсутствовать 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. Соответственно, термин "мутантный аллель *aco4*" или "аллель *aco4*" или "мутантный аллель гена *ACO4*" или мутантный аллель гена *ACO4* дикого типа", помимо прочего, относится к аллелю гена *ACO4*, 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 появлению плодов повышенной твердости после их вступления на стадию полностью красной окраски, если мутантный аллель представлен гомозиготной формой. Так, аллелем *ACO4* дикого типа в растениях, относящихся к виду *Solanum lycopersicum*, является последовательность мутантной кДНК *aco4* (мРНК), показанная в SEQ ID NO: 4. В белковой последовательности, которая кодируется этой мутантной кДНК *aco4* *Solanum lycopersicum*, 202 аминокислоты, и она показана в SEQ ID NO: 3. Термин "мутантный аллель *aco4*" также включает нокаутированные и условно нокаутированные аллели *aco4*, а также аллели *aco4*, кодирующие мутантный белок *aco4* с ослабленной или отсутствующей функцией. 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 *aco4* обладает ослабленной экспрессией соответствующего гена (дикого типа) по сравнению с аллелем дикого типа.

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.

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 вмешательства человека. Предпочтительно природный мутантный аллель встречается в растениях из естественной или селекционной популяции.

Термин "растение дикого типа" в настоящем документе относится к растению семейства Solanaceae, предпочтительно к растению вида *Solanum lycopersicum*, содержащему две копии аллеля *ACO4* дикого типа, в результате чего считается, что оно демонстрирует нормальное созревание плодов. 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.

В растении вида *Solanum lycopersicum* ген *ACO4* 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 последовательностью SEQ ID NO: 1. Белок, описанный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, представляет собой белок *ACO4* дикого типа *Solanum lycopersicum* и соответствует эталонной последовательности NCBI NP_001233928.1. В диких родственниках *Solanum lycopersicum* белок *ACO4* дикого типа соответственно кодируется ортологом гена *ACO4* дикого типа в *Solanum lycopersicum*. Предпочтительно ортолог гена *ACO4* *Solanum lycopersicum* в диких родственниках *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 последовательностью SEQ ID NO: 1.

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 *ACO4* *Solanum lycopersicum* дикого типа в диких родственных формах вида *Solanum lycopersicum*, была такая же биологическая функция, как и у белка *ACO4* *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 могут 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 *ACO4* *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 последовательностью SEQ ID NO: 1.

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 обозначены 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 менее, 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 (итого 1,000,000 пар оснований) или менее или около 0.5 Мб (итого 500,000 пар оснований) или менее, например около 200,000 п.о. (итого 200 тысяч пар оснований) или менее, около 100,000 п.о. (100 тыс. п.о.) или менее, около 50,000 п.о. (50 тыс. п.о.) или менее, около 25,000 п.о. (25 тыс. п.о.) или менее.

Термин "изогенное растение" относится к двум генетически идентичным растениям, единственным отличием в которых является мутантный аллель по настоящему изобретению. Для исследования воздействия свойства повышенной твердости плода можно скрестить линию (или разновидность) исследуемых растений с растением, содержащим мутантный аллель, который обеспечивает свойство повышенной твердости плодов, и отобрать потомство, экспрессирующее желательное свойство. При необходимости, может потребоваться скрестить представителей потомства друг с другом несколько раз, чтобы иметь возможность определить генетические детерминанты свойства повышенной твердости плодов 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 свойства повышенной твердости плодов. Влияние мутантного аллеля, обеспечивающего наличие свойства повышенной твердости плодов, можно сравнить в рамках всей линии (разновидности) исследуемого растения и его изогенной линии, не содержащей генетических детерминантов свойства повышенной твердости плодов.

Термин "нуклеотидная последовательность", или "молекула нуклеиновой кислоты", или "полинуклеотид" используют 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.

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.

"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.

"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.

Фрагмент мутантного белка относится к субпопуляции молекулы.

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

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

"Мутация" в молекуле нуклеиновой кислоты представляет собой изменение одного или нескольких

нуклеотидов по сравнению с последовательностью дикого типа, например, путем замены, делеции или вставки из одного или нескольких нуклеотидов.

"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".

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

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

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

"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.

"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.

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

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

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

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

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

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

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.

"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 используют параметры по умолчанию, штраф на внесение делеций = 10, штраф на продолжение делеций = 0,5 (как для выравнивания нуклеотидных последовательностей, так и выравнивания последовательностей белков). Для нуклеотидов по умолчанию используется матрица замен DNAFULL, а для белков - Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS, 89, 10915-10919). Выравнивания последовательности и показатели процента идентичности последовательности могут быть определены, например, с помощью компьютерных программ, таких как EMBOSS (которая доступна по адресу на сайте 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 свойство повышенной твердости плодов по настоящему изобретению, и могут быть выявлены белки конкретной нуклеиновой кислоты и аминокислотных последовательностей по настоящему изобретению, которые производят аналогичное воздействие относительно повышенной твердости плодов, как и растения по настоящему изобретению.

При использовании по тексту настоящего документа термин "гибридизация", как правило, используется для обозначения гибридации нуклеиновых кислот при соответствующих условиях жесткости (жесткие условия гибридации), которые будут очевидны для специалистов в данной области в зависимости от характера последовательности-зонда и целевых последовательностей. Условия гибридации 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-е изд., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк, 1989. Выбор условий, которые диктуются длиной последовательностей, проходящих гибридацию, в частности, длина последовательности-зонда, относительный GC-состав нуклеиновых кислот и количество допустимых несоответствий. Условия низкой жесткости являются предпочтительными, когда необходима частичная гибридация между цепочками с меньшими степенями комплементарности. Когда нужна идеальная или практически идеальная комплементарность, предпочтительными являются условия высокой жесткости. Для стандартных условий жесткости раствор гибридации содержит 6× S.S.C., 0,01 M EDTA, 1× раствора Денхардта и 0,5% SOS. Гибридацию выполняют при температуре 68°C на протяжении примерно от 3 до 4 ч для фрагментов клонированной ДНК и на протяжении примерно от 12 до 16 ч для общей эукариотической ДНК. При менее высоких показателях жесткости температура гибридации 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.

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 гибриди-

зацию. Например, молекула длиной в 100 нуклеотидов из 3'-кодирующего или некодирующего участка гена будет распознаваться и гибридизироваться 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.

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.

"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.

"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.

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 невозстанавливаемые клетки растений, растительные каллюсы, 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 согласно определению в настоящем изобретении.

Термин "растительная линия" или "линия скрещивания" относится к растению и его потомству.

"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.

"Обратное скрещивание" относится к способу скрещивания, согласно которому (отдельное) свойство, такое как способность к повышению твердости плода, 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 необязательно 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, отли-

чающееся 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), подвергают "обратному скрещиванию" с родительским растением указанного второго вида растений. После повторного обратного скрещивания свойство донорского генетического окружения, например, мутантный аллель, передающий свойство повышенной твердости плода по настоящему изобретению, будет включено в рекуррентное генетическое окружение.

Термины "с преобразованным геном", или "преобразованное растение", или "преобразование локуса" в данном контексте относятся к растениям, которые выводятся обратным скрещиванием, причем 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 получают 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).

"Пасленовые растения" или "растения семейства Solanaceae" - это растения ботанической семьи Solanaceae, т.е. любое растение семейства Solanaceae, включая дикие и культивируемые пасленовые растения. Ботаническая семья Solanaceae состоит примерно из 98 родов, среди которых с коммерческой точки зрения роды Solanum и Capsicum являются наиболее подходящими, поскольку они включают множество одомашненных видов, широко культивируемых и используемых в качестве продовольственных культур высокой экономической значимости.

Род Solanum состоит примерно из 1330 видов, включая исключительно важные продовольственные культуры S. lycopersicum (помидор), S. melongena (баклажан) и S. tuberosum (картофель).

Растения Solanum lycopersicum или "растения томата" - это другие травянистые растения семейства Solanaceae, которые имеют особую значимость в контексте настоящего изобретения. Растения томата являются многолетними в своем естественном районе распространения, но при этом культивируются как однолетние. Культивируемые растения томата, как правило, вырастают высотой в 1-3 м (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 виды Solanum lycopersicum" или "дикие родственные виды томата" 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.

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. перекрестно опыляемые 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.

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.

"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 рас-

тения из культуры клетки или культуры ткани или к вегетативному размножению. "Неспособная к размножению клетка" представляет собой клетку, которая не может быть регенерирована в целое растение.

"Среднее значение" в настоящем документе относится к среднему арифметическому значению.

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.

"Стадия созревания" плода томата может быть разделена на следующие этапы.

Стадия спелости с зеленовато-бурой окраской: поверхность полностью зеленая; оттенок зеленого может отличаться от светлого до темного, и зеленый цвет можно более подробно охарактеризовать как "144B" по цветовой таблице Королевского садоводческого общества (Королевское садоводческое общество 2007).

Стадия бланжевой спелости: имеется очевидный переход в цвете от зеленого к тускло-желтому, розовому или красному на более чем 10% поверхности, и при этом цвет стадии бланжевой спелости можно подробно охарактеризовать как "N144D" по цветовой таблице Королевского садоводческого общества (Королевское садоводческое общество 2007).

Стадия оранжевой окраски: цвет от 30 до 60% поверхности не является зеленым; в целом цвет оранжевый, причем его можно подробно охарактеризовать как "N163C/D" по цветовой таблице Королевского садоводческого общества (Королевское садоводческое общество 2007).

Стадия полностью красной окраски: цвет более 90% поверхности не является зеленым; в целом цвет красный, причем его можно подробно охарактеризовать как "44A/B" по цветовой таблице Королевского садоводческого общества (Королевское садоводческое общество 2007).

Соответственно, цвет плода можно классифицировать посредством сравнения цвета определенного плода с цветом по цветовой таблице Королевского садоводческого общества (www.rhs.org.uk). Альтернативные способы классификации цвета плодов томата включают применение стандартов США для сортов свежих помидоров (Министерство сельского хозяйства США, 1973 г., стандарты США для сортов свежих помидоров, Служба содействия сбыту сельскохозяйственной продукции, Вашингтон, округ Колумбия), например, посредством измерения цвета колориметром (Mutschler et al., 1992, *Horscience*, 27, p. 352-355).

Термин "твердость плода" относится к способности плода противостоять деформации, возникающей в результате приложения заданной механической силы. Твердость плода можно измерить, например, с использованием способов в соответствии с описанием далее в настоящем документе по тексту примеров. Например, прочность плода может определяться при помощи одноколонных настольных испытательных систем (Instron, ид. № системы: 3342L2018, динамометрический датчик, модель 2519-104) и программного обеспечения Bluehill (Instron, 825 Юниверсити Авеню, Норвуд, Массачусетс, 02062-2643, США) Плод томата сжимается между двумя плоскими стальными пластинами с увеличением усилия от 0,1 (Н) до 4 (Н). Прочность измерялась в виде силы (Н), которая необходима для сжатия плодов на миллиметр, с использованием динамометрического датчика Instron. В качестве альтернативы, твердость плода может измеряться посредством оценки сопротивления деформации в единицах, например, 0,1 мм при измерении пенетрометром, оснащенным соответствующим зондом (например, зонд на 3 мм) (Mutschler et al., 1992, *Horscience*, 27, p. 352-355) (Marinez et al., 1995, *Acta Horticulturae*, 412, p. 463-469). Специалистам известны и другие альтернативные способы, такие как использование текстурометра (Bui et al., 2010; *Международный журнал науки и продуктов питания*, том 13, выпуск 4). При использовании по тексту настоящего документа термин "повышенная твердость плода" относится к (статистически значимому) повышению твердости плода некоторых томатов, например плодов томата по настоящему изобретению, по сравнению с плодами томата соответствующих контрольных растений, например, плоды АСО4/АСО4 дикого типа, в ходе конкретной стадии созревания плода, например на стадии оранжевой окраски, на стадии полностью красной окраски и/или в конкретный момент времени после того, как плоды перешли на стадию полностью красной окраски. Мутантное растение (например, растение, являющееся гомозиготным по мутантному аллелю *асо4* (*асо4/асо4*)), которое производит плоды, обладающие повышенной твердостью после их вступления на стадию полностью красной окраски, соответственно производит плоды, причем средняя твердость плода в определенный момент времени после вступления на стадию полностью красной окраски повышается, предпочтительно повышается статистически значимо, по сравнению со средней твердостью соответствующих контрольных плодов в тот же момент времени (например, 21 день) после вступления плодов на стадию полностью красной окраски (например, плоды растений, гомозиготных по аллелю АСО4 дикого типа (АСО4/АСО4)). Мутантное растение (например, растение, являющееся гомозиготным по мутантному аллелю *асо4* (*асо4/асо4*)), которое производит плоды, обладающие повышенной твердостью плода через 21 день после их вступления на стадию полностью красной окраски, соответственно производит плоды, причем средняя твердость плода через 21 день

после вступления на стадию полностью красной окраски повышается, предпочтительно повышается статистически значимо, по сравнению со средней твердостью соответствующих контрольных плодов через 21 день после вступления плодов на стадию полностью красной окраски (например, плоды растений, гомозиготных по аллелю АСО4 дикого типа (АСО4/АСО4)).

Термин "срок хранения" или "срок хранения после сбора" указывает на (среднее) время, по истечении которого плод считается непригодным для продажи или потребления ("испорченный"). Срок хранения - это период времени, в течение которого продукты могут храниться, а заданное качество указанной части товаров остается приемлемым при ожидаемых условиях распределения, хранения и выставления. Влияние на срок хранения оказывают несколько факторов: подверженность воздействию света и температуры, передача газов (включая влажность), механические напряжения и загрязнение, например, микроорганизмами. Качество продукции зачастую моделируется математически на основании параметров твердости/мягкости плода. Под сроком хранения можно понимать (среднее) время, за которое плоды растительной линии начинают портиться и становиться непригодными для продажи и потребления, начиная, например, с момента перехода первого плода растения на стадию бланжевой спелости, с момента перехода первого плода на стадию полностью красной окраски или с момента сбора урожая. В соответствии с одним аспектом изобретения срок хранения мутантов по настоящему изобретению значительно дольше, чем срок хранения растений дикого типа, например, количество дней от момента перехода первого плода на стадию бланжевой спелости (или перехода первого плода на стадию оранжевой окраски или на стадию полностью красной окраски или с момента сбора урожая) до момента, когда первый плод начнет портиться или становиться непригодным для продажи или потребления, значительно больше чем, например, по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более дней по сравнению с плодами контрольных растений (таких как растения АСО4/АСО4 дикого типа), если растения выращивают в одинаковых условиях, а с плодами обращаются одинаково и также в одинаковых условиях. Таким образом, чтобы определить количество дней, необходимых для перехода с определенной стадии (например, со стадии бланжевой спелости, оранжевой окраски или полностью красной окраски) на стадию "испорченного" плода, день, когда первый плод контрольного растения дикого типа (выращенный в одинаковых условиях, как и мутантные растения, и находящийся на той же стадии развития) перейдет на определенную стадию (например, стадию бланжевой спелости или более позднюю стадию, стадию оранжевой окраски или стадию полностью красной окраски), может, например, приниматься в качестве начального момента (день 1), после наступления которого в дальнейшем плоды периодически (через определенные временные промежутки, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней) наблюдаются до дня, когда первый плод завершил нахождение в стадии полностью красной окраски и стал "испорченным" (что определяется визуально и/или посредством оценки твердости плода, например, в соответствии с описанием в настоящем документе). В этом случае слова "улучшенный", "увеличенный", "более длительный" и "продленный" при использовании вместе с выражением "срок хранения" являются взаимозаменяемыми и означают, что плоды растения томата по настоящему изобретению в среднем имеют более длительный срок хранения по сравнению с контрольными плодами (плоды АСО4/АСО4).

"Замедленное созревание" означает, что плоды растения или растительной линии томата (т.е. мутант) в среднем достигают стадии полностью красной окраски за гораздо более значительное количество дней с момента начала стадии с зеленовато-бурой окраской, стадии бланжевой спелости и/или оранжевой окраски созревания плода томата по сравнению с контрольными плодами дикого типа (например, плоды растений, являющихся гомозиготными по отношению к аллелю АСО4 дикого типа (АСО4/АСО4)). Замедленное созревание может измеряться по растению и/или с момента сбора урожая, как количество дней, необходимых для достижения стадии полностью красной окраски определенным процентом плода (например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и/или 100% плодов). Считается, что растение имеет фенотип с замедленным созреванием, если у 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и/или 100% плода на переход в стадию полностью красной окраски уходит по меньшей мере на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней больше, чем у контрольных плодов дикого типа на развитие до такой же процентной степени красноты плода. Очевидно, что каждая из комбинаций вышеуказанных вариантов количества дней (т.е. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15) с каждым вариантом % плода, достигшего стадии красной окраски (т.е. 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и/или 100%) включена в настоящий документ как для замедленного созревания, которое может измеряться по растению, так и после сбора урожая. Например, если у 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и/или 100% плода уйдет по меньшей мере на 2 дня больше на переход в стадию красной окраски по сравнению с контрольными плодами дикого типа на развитие до такой же процентной степени красноты плода. Еще одним примером того, как замедленное созревание может измеряться на растении и/или после сбора урожая, является ситуация, когда для достижения 100% плодов стадии красной окраски уйдет по меньшей мере на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней больше, чем у контрольных плодов дикого типа на развитие до такой же процентной степени красноты плода. День, когда первый плод контрольного растения дикого типа (выращенный в одинаковых условиях, как и мутантные растения, и находящийся на той же стадии развития) перейдет на определенную стадию (например, стадию бланжевой спелости), может, например, приниматься в качестве начального момента (день 1), после наступления которого в дальнейшем периодически (через определенные временные промежутки, напри-

мер, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней) будет производиться подсчет количества плодов, которые находятся на стадии бланжевой спелости, и количества плодов, которые находятся на стадии полностью красной окраски (например, как для линии мутантных растений, так и для соответствующих контрольных растений).

"Задержка стадии бланжевой спелости" относится к растениям томата, например, мутантам по настоящему изобретению, для которых необходимо значительно больше дней по сравнению с соответствующими контрольными растениями дикого типа, чтобы первые и/или все плоды перешли на стадию бланжевой спелости, например, по меньшей мере на 1 день больше, предпочтительно по меньшей мере на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 дней больше, чем для контрольных растений дикого типа, если их выращивают в таких же условиях.

При использовании по тексту настоящего документа термин "пониженная выработка этилена" относится к (статистически значимым) пониженным количествам этилена, вырабатываемым плодами томата, например плодами томата по настоящему изобретению, по сравнению с плодами томата соответствующих контрольных растений, например плоды дикого типа АСО4/АСО4, в ходе созревания плода (например, стадия оранжевой окраски и/или стадия полностью красной окраски). Такую выработку этилена предпочтительно измеряют посредством выполнения измерений этилена в режиме реального времени.

В данном документе и его формуле глагол "содержать" и его конъюгации используют 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, таким образом, элемент в единственном числе обычно означает "по меньшей 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 и способы по изобретению.

Настоящее изобретение относится к растению вида *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа, причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1.

Авторами изобретения неожиданным образом было установлено, что растения *Solanum lycopersicum*, гомозиготные по мутантному аллелю гена АСО4 дикого типа по настоящему изобретению, производят плоды томата (плоды асо4/асо4) с повышенными характеристиками созревания по сравнению с плодами, которые производятся растениями дикого типа, гомозиготными по гену АСО4 дикого типа (плоды АСО4/АСО4). В частности, было установлено, что плоды асо4/асо4 демонстрируют повышенную твердость плода после достижения им стадии полностью красной окраски. Было также неожиданно установлено, что мутантный аллель гена АСО4 по настоящему изобретению не оказывает негативного влияния на средний размер плода и среднее время созревания плодов со стадии бланжевой спелости до стадии полностью красной окраски. Это обеспечивает значительное улучшение по сравнению с ранее известными решениями. Например, имеющимся в настоящий момент плодам томата с увеличенным сроком хранения, как правило, также необходимо большее количество дней для созревания со стадии бланжевой спелости до стадии полностью красной окраски, и/или нужна дополнительная обработка, такая как обработка с применением стороннего источника этилена, чтобы плоды полностью вызрели.

Таким образом, мутантный аллель по настоящему изобретению предпочтительно приводит к получению плодов, обладающих повышенной твердостью после вступления плода в стадию полностью красной окраски, если указанный мутантный аллель присутствует в растении в гомозиготной форме. В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к растению вида *Solanum lycopersicum*, содержащему мутантный аллель в соответствии с изобретением, причем указанное растение является гомозиготным по мутантному аллелю. Указанное растение, которое является гомозиготным по мутантному аллелю, производит плоды (плоды асо4/асо4) с повышенной твердостью плода после вступления плодов на стадию полностью красной окраски по сравнению с контрольными плодами (например, плоды АСО4/АСО4). Таким образом, настоящее изобретение предпочтительно относится к растению вида *Solanum lycopersicum*, содержащему в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа, причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, причем растение является гомозиготным по мутантному аллелю, и указанное растение производит плоды с повышенной твердостью плода после вступления плодов на ста-

дию полностью красной окраски, причем указанные плоды, обладающие повышенной твердостью, демонстрируют повышенную способность противостоять деформации в результате приложения заданной механической силы по сравнению с плодами, которые произведены растениями дикого типа.

Соответственно, настоящее изобретение относится к растению вида *Solanum lycopersicum*, которое дает плоды, содержащие в своем геноме, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа. Ген АСО4 дикого типа кодирует белок, включающий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, например, 96, 97, 98, 98,3, 98,7, 99,0, или 99,3, или более предпочтительно 99,7% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, как установлено при помощи методов, описанных в тексте настоящего документа).

Соответственно, мутантный аллель гена АСО4 дикого типа приводит к нарушению нормального функционирования белка (дикого типа), закодированного геном АСО4. Описанный по тексту настоящего документа мутантный аллель может приводить к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа. Описанный по тексту настоящего документа мутантный аллель может также кодировать белок, в результате чего будет ослаблена или отсутствовать функция по сравнению с белком дикого типа. Таким образом, мутантный аллель, который обеспечивает повышенную прочность плодов, в случаях при его нахождении в гомозиготной форме может обуславливать сниженную экспрессию или даже отсутствие экспрессии продукта гена АСО4, который в иных условиях является функционирующим. В неограничивающем примере сниженная или отсутствующая экспрессия может становиться следствием одной или нескольких мутаций на регуляторном участке гена АСО4, например в промоторной последовательности гена АСО4. В другом неограничивающем примере сниженная или отсутствующая экспрессия может становиться следствием одной или нескольких мутаций в факторе транскрипции, который необходим для нормальной экспрессии (дикого типа) продукта гена АСО4 (например, функционального варианта белка АСО4 дикого типа). В другом неограничивающем примере такая сниженная или отсутствующая экспрессия может становиться следствием посттранскрипционного сайленсинга гена или РНК. Средства и способы определения уровня экспрессии данного гена хорошо известны в уровне техники, включая, помимо прочего, количественную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (количественная ОТ-ПЦР) для выявления и количественного определения конкретной мРНК и твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА) для обнаружения и количественного определения конкретного белка. Мутантный аллель, которым обусловлена повышенная твердость плода, в случаях при его нахождении в гомозиготной форме может обуславливать экспрессию белка со сниженной или отсутствующей функцией по сравнению с белком дикого типа (например, нефункционирующий вариант белка АСО4 дикого типа). В неограничивающем примере такая сниженная или отсутствующая функция может быть следствием мутации кодирующего участка гена АСО4, в результате которой, например, по сравнению с белком дикого типа замещается, вставляется или удаляется одна или несколько аминокислот (например, мутация со сдвигом рамки или в результате миссенс-мутации). Средства и способы определения функции белка хорошо известны в уровне техники, включая, помимо прочего, фенотипический анализ нормальной функции белка (например, определение нормального (т.е. неухудшенного) снижения твердости плода), биологические исследования ферментативной активности и *in silico* прогнозирования изменений аминокислот, которые влияют на функцию белка, как более подробно описано выше по тексту настоящего документа.

В соответствии с одним аспектом изобретение, таким образом, относится к клеткам растений или растениям вида *Solanum lycopersicum*, которые содержат мутантный аллель гена АСО4, кодирующий белок, которые отличаются тем, что такой мутантный аллель АСО4 содержит или обеспечивает одну или несколько мутаций, выбранных из группы, включающей:

- a) делецию, мутацию с усечением, вставку, точечную мутацию, нонсенс-мутацию, миссенс- или несинонимичную мутацию, мутацию сайта сплайсинга, мутацию со сдвигом рамки в геномной последовательности;
- b) мутацию в одной или нескольких регуляторных последовательностях;
- c) делецию, мутацию с усечением, вставку, точечную мутацию, нонсенс-мутацию, миссенс- или несинонимичную мутацию, мутацию сайта сплайсинга, мутацию со сдвигом рамки в кодирующей последовательности;
- d) делецию, мутацию с усечением, вставку, точечную мутацию, нонсенс-мутацию, миссенс- или несинонимичную мутацию, мутацию сайта сплайсинга, мутацию со сдвигом рамки в пре-мРНК или мРНК; и/или
- e) делецию, мутацию с усечением, вставку или замену одной или нескольких аминокислот в белке АСО4.

Вышеуказанный мутантный аллель приводит к снижению активности мутантного белка АСО4 по сравнению с белком АСО4 дикого типа в растении вида *Solanum lycopersicum*. Снижение активности происходит из-за нокаута экспрессии гена АСО4, нокаута экспрессии этого гена, потери функции кодируемого мутантного белка АСО4 или снижения функции мутантного белка АСО4. Мутантный аллель по настоящему изобретению может представлять собой "индуцированный мутантный аллель", т.е. мутант-

ный аллель, полученный в результате вмешательства человека, например, в результате мутагенеза. К соответствующим методам с мутагенезом относится химический мутагенез (например, EMS или MNU мутагенез или мутагенез за счет получения активных форм кислорода), а также радиационный мутагенез (например, с использованием УФ-излучения или ионно-лучевого излучения). Мутантные аллели по настоящему изобретению также можно получить при помощи методов направленного мутагенеза, таких как методы редактирования генома, включая, помимо прочего, методы направленного мутагенеза на основе CRISPR/Cas9 и методы направленного мутагенеза на основе CRISPR/Cpf1. Кроме того, мутантный аллель *aco4* по настоящему изобретению, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена *ACO4* и/или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа *ACO4* *Solanum lycopersicum*, также можно выявить путем скрининга диких томатов (например, местные сорта, линии интродукции растений, образцы из ЦГР и т.д.) либо путем скрининга ортологов гена *ACO4* *Solanum lycopersicum* у диких родственников *Solanum lycopersicum*. Указанный "естественный мутантный аллель", который может быть выявлен у дикого томата и/или дикого родственника *Solanum lycopersicum*, может быть интрогрессирован в культивируемое растение *Solanum lycopersicum* при помощи стандартных методов разведения, позволяющих получить растение по настоящему изобретению. Мутантный аллель по настоящему изобретению предпочтительно является индуцированным мутантным аллелем. Растение по настоящему изобретению предпочтительно является культивируемым растением *Solanum lycopersicum*.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к растению, которое содержит мутантный аллель гена *ACO4* дикого типа, причем мутантный аллель, описанный в настоящем документе, кодирует белок, который является усеченным по сравнению с белком дикого типа. В соответствии с одним аспектом изобретения, усеченный белок *ACO4* включает в себя большинство аминокислотных радикалов 1-500 SEQ ID NO: 1 или их фрагмент, что в контексте настоящего изобретения означает, что усеченный белок содержит самое большее аминокислотные радикалы 1-200 SEQ ID NO: 1 (т.е. аминокислотные радикалы, начиная включительно с аминокислоты 1 и заканчивая самое большее и включительно аминокислотой 200 SEQ ID NO: 1) или фрагмент указанных аминокислотных радикалов 1-200 SEQ ID NO: 1. Например, усеченный белок по настоящему изобретению включает в себя самое большее аминокислотные радикалы 1-150 SEQ ID NO: 1 или их фрагмент, самое большее аминокислотные радикалы 1-100 SEQ ID NO: 1 или их фрагмент или самое большее аминокислотные радикалы 1-50 SEQ ID NO: 1 или их фрагмент. В соответствии с одним аспектом изобретения мутантный аллель *ACO4* в растениях вида *Solanum lycopersicum* представляет собой последовательность мутантной кДНК (мРНК) *ACO4*, показанную в SEQ ID NO:4. В соответствии с одним аспектом изобретения мутантный аллель *ACO4* в растениях вида *Solanum lycopersicum* кодирует мутантный белок *ACO4*, показанный в SEQ ID NO: 3.

Растение по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну копию мутантного аллеля, как предусмотрено настоящим документом. Растения по настоящему изобретению могут быть гетерозиготными по мутантному аллелю по настоящему изобретению. Указанное гетерозиготное растение содержит (по меньшей мере) одну копию аллеля дикого типа и (по меньшей мере) одну копию мутантного аллеля по настоящему изобретению. Указанное гетерозиготное растение демонстрирует фенотип с особенностями созревания и твердостью плода, схожими с растениями дикого типа (т.е. растениями гомозиготными по аллелю *ACO4* дикого типа). Таким образом, настоящее изобретение также направлено на растения, которые содержат мутантный аллель *ACO4* по настоящему изобретению в гетерозиготной форме. Указанные гетерозиготные растения также могут предпочтительно использоваться по настоящему изобретению для разведения и получения потомства, которое является гомозиготным по мутантному аллелю *ACO4*, как далее указано в тексте настоящего документа. В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к растению, которое является гомозиготным по мутантному аллелю по настоящему изобретению. Такое растение, помимо прочего, характеризуется способностью давать плоды, которые обладают повышенной твердостью после вступления плода в стадию полностью красной окраски, как указано ниже по тексту настоящего документа. Растение по настоящему изобретению, которое является гетерозиготным по мутантному аллелю по настоящему изобретению, может также характеризоваться нормальной твердостью плодов и/или нормальным созреванием до достижения стадии полностью красной окраски. Нормальная твердость плода и нормальное созревание плода определяют на основе уменьшения твердости плода и времени, которое необходимо для созревания плодов, которые дают контрольные растения, которые являются гомозиготными по аллелю дикого типа.

Растения по настоящему изобретению могут быть представлены растением вида *Solanum lycopersicum*, как описано ниже по тексту настоящего документа, содержащим в своем геноме, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена *ACO4* дикого типа. В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к растению, как указано в настоящем документе, которое является инбредным растением, дигаплоидным растением или гибридным растением. В соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предусмотрено, что растение по настоящему изобретению является инбредным. Указанное инбредное растение является высокогомозиготным, например, в результате повторного само-

опыления 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 АСО4, 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 т.п. Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения предусмотрено растение вида *Solanum lycopersicum*, демонстрирующее повышенную твердость плода, как описано в настоящем документе, отличающееся тем, что растение является дигаплоидным. Настоящим изобретением также предусмотрены гибридные растения, которые могут обладать преимуществами, такими как повышенная однородность, жизнеспособность и/или устойчивость к заболеваниям.

Растения по настоящему изобретению могут применяться для получения плодов. Таким образом, настоящее изобретение относится к применению растения вида *Solanum lycopersicum*, в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, в качестве пищевой культуры. В частности, плоды, которые дают растения по настоящему изобретению, могут преимущественно использоваться в качестве пищевой культуры, поскольку указанные плоды обладают повышенной твердостью плода после вступления плодов в стадию полностью красной окраски.

Растения по настоящему изобретению могут применяться для получения материала для размножения. Такой материал для размножения включает материал для размножения, который подходит для и/или является результатом полового размножения, как, например, пыльца или семена. Такой материал для размножения включает 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, настоящее изобретение относится к применению растения вида *Solanum lycopersicum*, в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, в качестве источника материала для размножения.

Семена.

Настоящее изобретение относится к семенам, из которых может быть выращено растение по настоящему изобретению. Кроме того, изобретение относится к множеству таких семян. Семя по изобретению отличается от других семян наличием мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, как описано в настоящем документе, как фенотипически (на основании растений, которые могут давать плоды с фенотипом, предполагающим повышенную твердость плодов по настоящему изобретению), так и 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. Соответственно, настоящее изобретение относится к семенам, из которых может быть выращено растение по настоящему изобретению, причем указанные семена содержат в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, и причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа, и/или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. К семенам, к примеру, относятся семена, получаемые от растения по изобретению, которое является гетерозиготным по мутантному аллелю после самоопыления, и, при необходимости, выборка семян, которые содержат одну или две копии мутантного аллеля (например, при помощи неразрушающих методов отбора образцов семян и анализа присутствия мутантного аллеля асо4), или семена, полученные после перекрестного опыления, например опыления растения по изобретению пыльцой другого пасленового растения, предпочтительно от другого растения вида *Solanum lycopersicum*, или другого растения *Solanum lycopersicum* пыльцой растения по изобретению.

В частности, настоящее изобретение относится к пыльце или семенам, получаемым из растения по настоящему изобретению, либо семенам, из которых может быть выращено растение по изобретению, причем растение вида *Solanum lycopersicum* содержит в своем геноме, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа, причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности последовательности SEQ ID NO: 1, например, 96, 97, 98, 98,3, 98,7, 99,0, или 99,3, или более предпочтительно 99,7% идентичности последовательности SEQ ID NO: 1.

В частности, настоящее изобретение относится к пыльце или семенам, получаемым от растения по настоящему изобретению, либо семенам, из которых может быть выращено растение по изобретению, причем пыльца или семена содержат в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, как описано в настоящем документе, который дает фенотип с повышенной твер-

достью плода в случаях, когда он находится в гомозиготной форме. В частности, настоящее изобретение относится к семенам, из которых может быть выращено растение по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к семенам, получаемым способами производства растений, описанными по тексту настоящего документа.

В соответствии с одним аспектом изобретения множество семян упаковывают в тару (например, 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.

Части растений и вегетативное размножение.

В рамках еще одного аспекта изобретение касается части растения, которая получена (или которая может быть получена) из растения по изобретению, как предусмотрено настоящим документом, и тары или упаковки, содержащей указанную часть растения.

В частности, настоящее изобретение относится к части растения по настоящему изобретению, причем указанная часть растения в своем геноме содержит по меньшей мере одну копию мутантного аллеля АСО4, как указано в настоящем документе, предпочтительно, причем данная часть может быть представлена наименованием из группы, в которую входит плод, лист, пыльник, пестиком, стебель, черешок, корень, семяпочка, пыльца, протопласт, ткань, семя, цветок, семядоля, гипокотиль, зародыш и клетка. Изобретение охватывает различные стадии развития указанных частей растений.

В частности, оно относится к плодам, которые дают растения по настоящему изобретению. Плод по изобретению отличается от других плодов наличием мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, как описано в настоящем документе, как фенотипически (на основании плодов с фенотипом, предполагающим повышенную твердость плодов по настоящему изобретению), так и 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. Соответственно, настоящее изобретение относится к плодам томатов, причем указанные плоды томатов содержат в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, и причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа, и/или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. Растения по настоящему изобретению могут быть гетерозиготными по мутантному аллелю гена АСО4. Плоды, получаемые из таких гетерозиготных растений, уже демонстрируют фенотип, который отличается от плодов, которые получают из растений, которые являются гомозиготными по аллелю дикого типа гена АСО4. Предпочтительно плод является гомозиготным по мутантному аллелю гена АСО4 и демонстрирует повышенную твердость плода после вступления плода в стадию полностью красной окраски. Настоящее изобретение также касается (переработанного) пищевого продукта, в состав которого входят плоды, получаемые из растений в соответствии с описанием в настоящем документе. Предпочтительно плод, входящий в состав указанного (переработанного) пищевого продукта, получают из растения, которое является гомозиготным по мутантному аллелю гена АСО4 и, соответственно, демонстрирует повышенную твердость плода после вступления плода в стадию полностью красной окраски.

Плод, который является гомозиготным по мутантному аллелю гена АСО4, предпочтительно не демонстрирует (статистически значимого) различия в размере плода по сравнению с плодами генетически идентичных растений, которые содержат по меньшей мере одну копию аллеля дикого типа гена АСО4. Кроме того, плод, который является гомозиготным по мутантному аллелю гена АСО4, предпочтительно не демонстрирует (статистически значимого) различия в количестве дней, необходимых для созревания плода со стадии бланжевой спелости до достижения полностью красной окраски по сравнению с плодами генетически идентичных растений, которые содержат по меньшей мере одну копию аллеля дикого типа гена АСО4. В контексте настоящего изобретения неожиданным образом было обнаружено, что плоды, которые растут на растениях по настоящему изобретению, обладают обычной формой и размером. В контексте настоящего изобретения также неожиданным образом было обнаружено, что плоды, которые растут на растениях по настоящему изобретению, обладают обычной твердостью плода и/или обычным созреванием на стадиях созревания плода до того, как достигнут полностью красной окраски. Таким образом, настоящее изобретение впервые предусматривает плод томата от растения *Solanum lycopersicum*, который обладает увеличенным сроком хранения по сравнению с плодами генетически идентичных растений дикого типа (т.е. растений, которые содержат по меньшей мере одну копию аллеля дикого типа гена АСО4), при этом это негативно не сказывается на размерах плода или особенностях созревания, таких как формирование цвета и/или время созревания плодов, которое необходимо для достижения полностью красной окраски.

Настоящее изобретение также относится к части растения по настоящему изобретению, причем указанная часть растения может представлять собой лист, пыльник, пестик, стебель, черешок, корень, семяпочку, пыльцу, протопласт, ткань, семя, цветок, семядолю, гипокотиль, зародыш или клетку.

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

Клетка, которая не обладает способностью к регенерации, представляет собой клетку, которая не может быть регенерирована 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.

В еще одном аспекте клетка растения представляет собой репродуктивную клетку, такую как семя-зачаток 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 (например, в результате химической обработки), в результате регенерации может быть получено гаплоидное растение. В соответствии с одним аспектом изобретения растение по изобретению, которое содержит мутантный аллель АСО4, является гаплоидом или двойным гаплоидом растения *Solanum lycopersicum* по настоящему изобретению.

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, каллюс, корень, кончик корня, пыльник, цветок, семя или стебель, либо их часть, либо меристематическая клетка, соматическая клетка или репродуктивная клетка.

Настоящее изобретение также относится к растению с вегетативной формой размножения, причем растение размножается из части растения по настоящему изобретению.

Кроме того, предусмотрены изолированные клетки, клеточные культуры *in vitro* и тканевые культуры, культуры протопластов, части растений, материал, собираемый в качестве урожая (например, собираемые плоды томатов), пыльца, завязи, цветки, семена, тычинки, части цветка и т.д., в состав каждой клетки которых входит не менее одной копии мутантного аллеля АСО4 по настоящему изобретению. Таким образом, при регенерации указанных клеток или тканей или выращивании из них полноценного растения *Solanum lycopersicum*, в состав растения входит мутантный аллель, который может приводить к увеличению твердости плодов после вступления плодов в стадию полностью красной окраски в случаях, когда он находится в гомозиготной форме.

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*.

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 отделяют от материнского.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения предусмотрен способ, включающий:

(a) получение части растения по изобретению (например, клеток или тканей, например отростков);

(b) вегетативное размножение части указанного растения для получения точно такого же растения на основании части растения.

Таким образом, использование вегетативных частей растений по изобретению для клонального/вегетативного размножения также является аспектом изобретения. В соответствии с одним аспектом изобретения предусмотрен способ вегетативного размножения растения *Solanum lycopersicum* по изобретению, которое содержит две копии мутантного аллеля АСО4. Также предусмотрено вегетативное получение растения, которое содержит две копии мутантного аллеля АСО4.

В рамках еще одного аспекта растения по настоящему изобретению, в состав которого входят две копии мутированного аллеля АСО4 по настоящему изобретению, размножение осуществляют способом соматического эмбриогенеза.

Также предусмотрена регенерация растения *Solanum lycopersicum* из любой из указанных выше частей растений либо регенерация из описанных выше клеточных или тканевых культур, при этом указанное регенерируемое растение содержит в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа, причем мутантный аллель кодирует белок со снижением

функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95 идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, например, 96, 97, 98, 98,3, 98,7, 99,0, или 99,3, или более предпочтительно 99,7% идентичности последовательности SEQ ID NO: 1. Данное растение также может классифицироваться как вегетативное размножение растений по изобретению. Предпочтительно регенерированное растение является гомозиготным по мутированному аллелю гена АСО4 по настоящему изобретению и, таким образом, может давать плоды, которые обладают повышенной твердостью после вступления плода в стадию полностью красной окраски.

Изобретение также относится к пищевому или исходному продукту, в состав которого входит или который состоит из части растения, описанной в настоящем документе. Пищевой или исходный продукт может быть свежим или переработанным, например консервированным, обработанным паром, отваренным, жареным, бланшированным, замороженным и т.д. В качестве примеров можно привести бутерброды, салаты, соки, соусы, пасты из плодов, кетчуп и иные пищевые продукты, в состав которых входит плод или часть плода растения по изобретению.

Настоящим изобретением также предусмотрено использование нуклеиновой кислоты, кодирующей белок АСО4, для идентификации растений вида *Solanum lycopersicum*, которые могут давать плоды повышенной твердости, после вступления плодов в стадию полностью красной окраски, причем указанный белок АСО4 включает в себя по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, например, 96, 97, 98, 98,3, 98,7, 99,0, или 99,3, или более предпочтительно 99,7% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1.

Настоящим изобретением также предусмотрено использование нуклеиновой кислоты, кодирующей белок АСО4, для выращивания растений вида *Solanum lycopersicum*, которые могут давать плоды повышенной твердости, после вступления плодов в стадию полностью красной окраски, причем указанный белок АСО4 включает в себя по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, например, 96, 97, 98, 98,3, 98,7, 99,0, или 99,3, или более предпочтительно 99,7% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1.

Растения и потомство.

В рамках еще одного аспекта 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 в составе воспроизводимого (для размножения семенами или вегетативного размножения) присутствует по меньшей мере одна копия мутированного аллеля АСО4 по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к растению вида *Solanum lycopersicum*, которое выращивают из семян в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе. Таким образом, настоящее изобретение относится к растению *Solanum lycopersicum*, которое выращивают из семян с использованием способа получения растения *Solanum lycopersicum*, описанного в настоящем документе.

Кроме того, изобретение относится к потомству, для которого характерен или которое сохраняет фенотип повышенной твердости плодов в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе (который передается мутированным аллелем АСО4), такому 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, изобретением предусмотрено потомство, которое является гомозиготным по мутантному аллелю гена АСО4 и может давать плоды, которые обладают повышенной твердостью плода после вступления плода в стадию полностью красной окраски. В соответствии с одним аспектов изобретение относится к растениям-потомкам, содержащим мутантный аллель АСО4, таким как растения-потомки, которые получают из растений *Solanum lycopersicum*, которые содержат мутантный аллель АСО4, с использованием одного или нескольких способов из группы, в которую входят самоопыление, скрещивание, мутация, двойное получение гаплоидов или трансформация. Предпочтительными мутациями являются антропогенные мутации и соматональные мутации. В соответствии с одним аспектом изобретения растения или семена изобретения также могут подвергаться мутациям (например, в результате облучения, химического мутагенеза, теплообработки, TILLING подхода, целенаправленного мутагенеза и т.д.) и/или могут отбираться мутированные семена или растения (например, соматональные 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. Трансформацию осуществляют с использованием стандартных методов, таких как трансформация посредством *Agrobacterium tumefaciens* или баллистической трансфекции, после чего выполняют селекцию трансформированных клеток и регенерацию в растения. Желательное свойство (например, гены, передающие резистентность к заболеваниям, вредите-

лям, гербицидам, фунгицидам или инсектицидам и т.д.) может быть придано растениям или их потомству путем трансформации растения по изобретению или его потомства при помощи трансгена, который придает желательное свойство, причем трансформированное растение сохраняет мутантный аллель АСО4 и, в случаях, когда мутантный аллель АСО4 представлен гомозиготной формой, фенотип повышенной твердости плодов, который он передает, и приобретает желательное свойство.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения семян, включающему скрещивание растения по изобретению с самим собой или другим растением, а также сбор полученных в результате семян. Еще в одном аспекте 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 или мужского пола для получения семян, и в этом случае растения, выращенные из указанных семян, включают в себя мутантный аллель АСО4, который входит в состав таких семян. Настоящее изобретение также относится к выращиванию растения из семян в соответствии с настоящим документом.

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 мутантного аллеля АСО4.

Настоящее изобретение также относится к способу получения плодов томата с увеличенным сроком хранения, причем указанный способ включает выращивание растения по настоящему изобретению и сбор плодов, произведенных указанными растениями. Предпочтительно, чтобы растение, которое дает плоды томатов и обладает увеличенным сроком хранения в соответствии с методом настоящего изобретения, было гомозиготным по мутантному аллелю дикого типа гена АСО4, как описано в настоящем документе, и, соответственно, обладало повышенной твердостью плодов, которые достигли полностью красной окраски (по сравнению с плодами генетически идентичных растений дикого типа (т.е. растениями, которые содержат по меньшей мере одну копию аллеля дикого типа гена АСО4)).

Настоящее изобретение также относится к способу идентификации и/или отбора растения или части растения вида *Solanum lycopersicum*, содержащим мутантный аллель гена АСО4 дикого типа, включающий определение того, содержит ли растение или часть растения мутантный аллель гена АСО4, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и, при необходимости, отбор растения или части растения, содержащих по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, например, 96, 97, 98, 98,3, 98,7, 99,0, или 99,3, или более предпочтительно 99,7% идентичности последовательности SEQ ID NO: 1. В соответствии с описанием в настоящем документе мутантный аллель по настоящему определению при его нахождении в гомозиготной форме приводит к получению плодов, обладающих повышенной твердостью после вступления плода в стадию полностью красной окраски. Соответственно, настоящим изобретением предусмотрен способ идентификации и/или отбора растения или части растения вида *Solanum lycopersicum*, включающий определение того, содержит ли растение или часть растения мутантный аллель гена АСО4, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа, или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и, при необходимости, отбор растения или части растения, содержащих по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, например, 96, 97, 98, 98,3, 98,7, 99,0, или 99,3, или более предпочтительно 99,7% идентичности последовательности SEQ ID NO: 1, и причем мутантный аллель при его нахождении в гомозиготной форме придает плодам, которые достигли полностью красной окраски, повышенную крепость.

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

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

Также можно использовать другие анализы генотипирования. Например, также может использо-

ваться анализ генотипирования TaqMan SNP, высокоразрешающее плавление (HRM), чипы SNP-генотипирования (например, Fluidigm, Illumina и т.д.) или секвенирование ДНК.

Молекулярные маркеры также могут использоваться в качестве дополнительного инструмента идентификации растений (либо частей растений или получаемых из них нуклеиновых кислот), которые содержат мутантный аллель АСО4. Например, можно разработать один или несколько молекулярных маркеров, которые демонстрируют тесную генетическую (и предпочтительно физическую) связь с мутантным аллелем АСО4. Наиболее предпочтительно мутация причинных генов также может использоваться в качестве молекулярного маркера для идентификации растений (либо частей растений или получаемых из них нуклеиновых кислот), которые содержат мутантный аллель АСО4. Соответствующие молекулярные маркеры могут быть разработаны за счет скрещивания растения *Solanum lycopersicum* по настоящему изобретению (предпочтительно с возможностью получения плодов, которые обладают повышенной твердостью плодов после вступления плодов в стадию полностью красной окраски) 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 с повышенной твердостью плода, 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 признак повышенной твердости плодов по настоящему изобретению, а также установить их порядок и генетическую отдаленность (сантиморганиду, сМ) от гена АСО4 (или локуса). Молекулярные маркеры, которые тесно сцеплены с локусом АСО4, 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 АСО4 (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 используют в МС. Более предпочтительно в МС используют фланкирующие маркеры, т.е. по одному маркеру на каждой стороне локуса мутантного аллеля АСО4.

Предпочтительно растение или часть растения подвергают этапу индуцирования мутаций перед определением того, содержит ли растение или часть растения мутантный аллель гена АСО4. Указанный этап индуцирования мутаций может включать в себя контактирование указанного растения или части растения с мутагеном. Соответственно, настоящим изобретением предусмотрен способ, включающий контактирование растения или части растения вида *Solanum lycopersicum* с мутагеном, после чего выполняют выявление и/или отбор растения или части растения, в состав которой входит мутантный аллель гена АСО4 дикого типа, в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе. Соответственно, указанный этап идентификации и/или отбора растения или части растения вида *Solanum lycopersicum*, содержащих мутантный аллель гена АСО4 дикого типа, включающий определение того, содержит ли растение или часть растения мутантный аллель гена АСО4, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа, или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и, при необходимости, отбор растения или части растения, содержащих по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. Методы с мутагенезом, которые демонстрируют особую эффективность в контексте настоящего изобретения, включают в себя химический мутагенез (например, EMS или MNU мутагенез или мутагенез за счет получения активных форм кислорода) или иные методы ненаправленного мутагенеза (например, радиационный мутагенез с использованием, к примеру, УФ-излучения или ионно-лучевого излучения). Указанный этап индуцирования мутаций также может охватывать методы направленного мутагенеза, такие как редактирование генома с использованием модифицированных нуклеаз. В рамках указанных методов редактирования генома выполняют индуцирование сайт-специфичного двухнитевого разрыва с использованием модифицированной нуклеазы, после которого указанный двухнитевой разрыв может быть восстановлен за счет применения механизмов репарации двухнитевых разрывов эндогенной ДНК клетки (например, механизм репарации, направляемой гомологией), что позволяет выполнять сайт-специфичное удаление, модификацию, вставку или замену ДНК в целевой клетке. К модифицированным нуклеазам, которые используют в рамках методов редактирования генома, относятся мегануклеазы, цинк-пальцевые нуклеазы (ЦПН), нуклеазы на основе эффлекторов, 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; см., например, Brooks et al. (2014), *Plantio Physiol.* 166, 1292-1297 и WO 2016/205711 A1.

Растительный материал, который подвергают индуцированию мутации, предпочтительно включает в себя аллель АСО4 дикого типа в гомозиготной форме. Этап индуцирования мутаций впоследствии приводит к мутациям аллеля АСО4 дикого типа, в результате чего получают мутантный аллель АСО4, который дает фенотип плодов повышенной твердости по настоящему изобретению.

В трансгенные растения также можно ввести мутантный аллель АСО4 по изобретению, используя известные в науке методики трансформации и регенерации растений. Может быть выбрано "элитное событие", которое представляет собой событие трансформации, при котором химерный ген (содержащий промотор, который функционально связан с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует белок АСО4, который приводит к утрате функции, или белок АСО4, который приводит к ее ослаблению) вводится в определенное место генома, что обеспечивает хорошую экспрессию необходимого фенотипа. Также могут быть получены трансгенные растения, которые включают в себя конструкт, который снижает или приводит к утрате экспрессии эндогенного гена АСО4 (дикого типа), как, например, конструкт РНК-и.

Настоящее изобретение соответственно касается способа получения растения вида *Solanum lycopersicum* по изобретению, включающего в себя следующие этапы:

- (a) получение растительного материала от растений вида *Solanum lycopersicum*;
- (b) проведение мутагенеза указанного растительного материала для получения мутировавшего растительного материала;
- (c) анализ указанного мутировавшего растительного материала для выявления растения не менее чем с одной мутацией в гене АСО4, отличающегося тем, что ген АСО4 дикого типа включает в себя по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, например, 96, 97, 98, 98,3, 98,7, 99,0, или 99,3. или более предпочтительно 99,7% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1.

TILLING-подход (ориентация индуцированных локальных повреждений в геномах) - это общий метод обратной генетики, который использует традиционные методы ненаправленного мутагенеза для создания библиотек мутировавших единиц, которые затем подвергают высокому пропускному скринингу для обнаружения специфических мутаций. TILLING-подход, как правило, сочетает в себе химический мутагенез со скринингом мутаций групп ПЦР-продуктов, что приводит к изоляции неправильных смысловых и несмысловых мутантных аллелей генов-мишеней. Таким образом, TILLING-подход использует методы традиционного ненаправленного мутагенеза, как описано в настоящем документе, после чего выполняют скрининг с высокой пропускной способностью для мутаций в определенных генах-мишенях, таких как ген АСО4 согласно данному изобретению. S1 нуклеазы, такие как CEL1 или ENDO1, используют для расщепления гетеродуплексов мутантного и дикого вида ДНК мишени и выявления расщепления продуктов с использованием, например, электрофореза, таких как LI-COR гелевой анализатор системы, см., например, Henikoff et al., *Plant Physiology*, 2004, 135:630-636. TILLING-подход применяют для многих видов растений, включая пасленовые культуры, такие как томат (см. http://tilling.ucdavis.edu/index.php/Tomato_Tilling), рис (Till et al., 2007, *BMC Plant Biol.* 7:19), арабидопсис (Till et al., 2006, *Methods Mol. Biol.* 323:127-35), рапс, кукуруза (Till et al., 2004, *BMC Plant Biol.* 4:12) и т.д. Также приведено описание EcoTILLING-подхода, в котором обнаруживаются мутанты в природных популяциях, см. Till et al., 2006 (*NatProtoc.* 1:2465-77) и Comai et al., 2004 (*Plant J.* 37:778-86).

В соответствии с одним аспектом изобретения (кДНК или геномные) последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие такие мутантные белки АСО4, состоят из одной или нескольких смысловых и/или несмысловых мутаций, например переходов (замена пурина на другой пурин (A↔G) или пиримидина на другой пиримидин (C↔T)) или трансверсий (замена пурина на пиримидин, или наоборот (C/T↔A/G)). В соответствии с одним аспектом изобретения в нуклеотидной последовательности присутствует одна или несколько смысловых и/или несмысловых мутаций, кодирующие экзоны АСО4 или по существу аналогичный домен варианта белка АСО4, т.е. домен, включающий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, например, 96, 97, 98, 98,3, 98,7, 99,0, или 99,3, или более предпочтительно 99,7% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1.

В соответствии с одним аспектом изобретения предусмотрена нуклеотидная последовательность АСО4, в которой присутствует одна или несколько смысловых и/или несмысловых мутаций в одной или нескольких последовательностях, кодирующих экзоны, а также растение, которое содержит мутантный аллель, который позволяет получить растение, которое может давать плоды повышенной твердости после вступления плодов в стадию полностью красной окраски в случаях, когда указанный мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

В соответствии с одним аспектом изобретения на основе TILLING-популяции определяют и/или выявляют растение или часть растения, которые были получены в результате воздействия на растение или части растений мутагеном. Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения предусмотрен способ получения, включающий следующие этапы:

- (a) предоставление TILLING-популяции растений вида *Solanum lycopersicum*, отличающейся тем,

что указанную TILLING-популяцию предпочтительно получают путем воздействия мутагеном на растение или его часть;

(b) скрининг указанной TILLING-популяции на предмет наличия мутантов гена ACO4, причем ген ACO4 дикого типа кодирует белок, включающий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, например, 96, 97, 98, 98,3, 98,7, 99,0, или 99,3, или более предпочтительно 99,7% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1; а также

(c) отбор из мутантных растений (b) тех растений (или потомков указанных растений), которые в состоянии давать плоды повышенной твердости после вступления плода в стадию полностью красной окраски.

В случае с мутантными растениями (M1) предпочтительно используют одно- или многократное самоопыление, например, M2 популяции или предпочтительно M3 или M4 популяции для фенотипирования. В популяциях M2 мутантный аллель находится в соотношении 1 (гомозиготный для мутантного аллеля):2 (гетерозиготный для мутантного аллеля):1 (гомозиготный для аллеля дикого вида).

Настоящее изобретение также касается способа получения растения вида *Solanum lycopersicum*, содержащего в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена ACO4, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена ACO4 дикого типа или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, при этом указанный способ включает в себя следующие этапы:

(i) скрещивание первого растения вида *Solanum lycopersicum* и второго растения, причем первое растение *Solanum lycopersicum* является растением по настоящему изобретению;

(ii) при необходимости, сбор семян, полученных в результате скрещивания (i), и отбор семян, содержащих в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена ACO4, как указано в настоящем документе.

Предпочтительно и первое растение *Solanum lycopersicum*, и второе растение *Solanum lycopersicum* на этапе (i) способа получения растения *Solanum lycopersicum*, предусмотренного настоящим документом, являются растениями по настоящему изобретению. Более предпочтительно и первое растение *Solanum lycopersicum*, и второе растение *Solanum lycopersicum* на этапе (i) способа получения растения *Solanum lycopersicum*, предусмотренного настоящим документом, в отношении мутантного аллеля являются гомозиготными растениями по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к выращиванию растений из семян, полученных способом выявления и/или отбора растения или части растения вида *Solanum lycopersicum*, содержащих мутантный аллель гена ACO4, как указано в настоящем документе. Настоящее изобретение также относится к выращиванию растения из семян, полученных способом получения растений вида *Solanum lycopersicum*, содержащих в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена ACO4, как указано в настоящем документе.

Настоящее изобретение также относится к способу получения растения вида *Solanum lycopersicum*, которое в состоянии давать плоды повышенной твердости после вступления плодов в стадию полностью красной окраски, путем выращивания семян по настоящему изобретению.

В соответствии с одним аспектом изобретения свойство твердости плодов по настоящему изобретению обеспечивается за счет мутации аллеля ACO4, или ортологичного аллеля, или гомологичного аллеля. В соответствии с одним аспектом изобретения, соответственно, предусмотрен специфический мутантный аллель ACO4.

В соответствии с одним аспектом, особенно применительно к Европейской патентной конвенции, растения по настоящему изобретению получены не исключительно посредством биологического процесса, как, например, определено в правиле 28(2) ЕРС. В случае наличия такого пункта об отказе от ответственности в формуле европейского патента необходимо отметить, что использование растения, содержащего мутантный аллель по настоящему изобретению (например, коммерческой разновидности заявителя) для скрещивания мутантного аллеля в рамках другого фона для получения *Solanum lycopersicum*, по-прежнему подпадает под действие формулы, даже несмотря на то, что исключительно биологический процесс (только скрещивание и селекция) мог быть использован для переноса аллеля в другой фон.

Другие варианты осуществления изобретения относятся к следующим вариантам осуществления, которые нельзя рассматривать по отдельности, и при этом могут быть объединены с другими вариантами осуществления изобретения, указанными по тексту настоящего документа. Предпочтительно указанная ниже клетка или клетки неспособны к регенерации в соответствии с определением, приведенным для данного понятия по тексту выше. В качестве альтернативы указанная ниже клетка или клетки неспособны к размножению. При использовании по тексту настоящего документа, термин "растительная клетка, которая неспособна к размножению" означает растительную клетку, которая не в состоянии поддерживать свою жизнедеятельность путем синтеза углеводов и белка из неорганических веществ, таких как вода, диоксид углерода, минеральные соли и т.д. в результате фотосинтеза.

В соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения позволяет получить клетку растения вида *Solanum lycopersicum*, содержащего в своем геноме по меньшей мере одну копию

мутантного аллеля гена АСО4, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа и/или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1.

Клетка по предыдущему варианту осуществления изобретения, причем мутантный аллель при его нахождении в гомозиготной форме приводит к получению плодов, обладающих повышенной твердостью после вступления плода в стадию полностью красной окраски.

Клетка по предыдущим вариантам осуществления изобретения, причем растение является гомозиготным по мутантному аллелю.

Клетка по предыдущим вариантам осуществления изобретения, причем мутантный аллель кодирует белок, который является усеченным по сравнению с белком дикого типа.

Клетка по предыдущим вариантам осуществления изобретения, причем указанные плоды обладают повышенной твердостью после вступления плодов в стадию полностью красной окраски, а также нормальной крепостью плодов и/или нормальным созреванием до достижения стадии полностью красной окраски.

Клетка по предыдущим вариантам осуществления изобретения, причем растение является инбредным растением, дигамноидным растением или гибридным растением.

Применение растения вида *Solanum lycopersicum* в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, в качестве культуры для получения плодов для употребления.

Применение растения вида *Solanum lycopersicum* в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, в качестве источника материала для размножения.

Примеры

Пример 1.

Случайный мутагенез, после которого выполняют прямой скрининг, эффективен для определения мутантов томатов с улучшенными характеристиками созревания.

Мутации могут быть вызваны ионизирующим излучением, в результате которого возникают двухцепочечные разрывы в ДНК и локальные окислительные повреждения участков из-за образования активных форм кислорода. Одним из продуктов окисления, образующихся под воздействием АФК, является 8-оксо-гидродеоксигуанозин (8-оксо-дГ), который может вызывать трансверсию в ДНК.

Мутации можно осуществлять в пыльце путем сбора цветочных почек и их облучения различными дозами при комнатной температуре, например, 100 Гр, γ -лучи из источника ^{60}Co (Akbulak & Seniz (2009), *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37:361-367). Для скрещивания необработанных растений может использоваться облученная пыльца, которая содержит мутации, варьирующиеся от замещения одного основания до больших делеций, которые охватывают несколько мегабаз (Ryouhei Morita, et al. (2009), *Genes Genet Syst.* 84:361-70). Семена, полученные в результате скрещивания (F1), можно посадить повторно, при этом жизнеспособные семена выживут и из них вырастут растения, каждое из которых будет обладать своим собственным набором специфических мутаций. По каждому отдельному растению собирают семена по F1, после чего они в свою очередь проращивают для целей фенотипирования. Выполняют сегрегацию мутаций в семействах F2, а также проводят оценку их фенотипических последствий. Соотношение сегрегации указывает на рецессивный или доминантный характер мутаций.

Пример 2.

Случайный мутагенез, после которого выполняют обратный скрининг мутантной TILLING-популяции.

Крайне гомозиготная инбредная линия, используемая в коммерческом разведении томатов, может быть использована для мутагенеза следующим протоколом. После впитывания семян на влажной бумаге Ватмана® в течение 24 ч ~20000 семян, разделенных на 8 партий по 2500, соответственно, вымачивают в 100 мл особо чистой воды и этилметансульфонате (EMS) в концентрации 1% в конических колбах. Колбы несильно встряхивают в течение 16 ч при комнатной температуре. Наконец, EMS промывают проточной водой. После обработки EMS семена непосредственно высеивают в теплице. Из проросших семян, достаточное количество ростков пересаживают в поле. Из растений, выращенных из указанных ростков, которые выжили и дали плоды, берут по меньшей мере один плод. Например, с каждого оставшегося M1 мутантного растения берут один плод и изолируют семена. Из полученной популяции, которая называется популяцией M2, ввиду малого набора семян могут быть исключены специфические семейства.

ДНК экстрагируют из группы 10 семян, полученных из каждой посевной партии M2. По каждой мутантной линии совокупность из 10 семян помещают в глубокую трубку Micronic®; <http://www.micronic.com> из планшета с 96 глубокими лунками, в каждую трубку добавляют два шарика из нержавеющей стали. Трубки и семена замораживают в жидком азоте в течение 1 мин, после чего семена сразу же истирают в мелкий порошок при помощи шейкера Deerwell (измельчитель Vaskon 96, Бельгия, <http://www.vaskon.com>) в течение 2 мин при частоте 16,8 Гц (80% от максимальной скорости). В планшет с образцом добавляют 300 мкл лизирующего буфера Agowa® из набора AGOWA® для выделе-

ния ДНК растений <http://www.agowa.de>, порошок в виде взвеси добавляют в раствор путем встряхивания в течение 1 мин на частоте 16,8 Гц в шейкере Deerpwell. Выполняют центрифугирование растений в течение 10 мин при 4000 об/мин. На планшет 96 Kingfisher при помощи станции Janus MDT® (Perkin Elmer, USA; <http://www.perkinelmer.com>) (96 головок) наносят 75 мкл супернатанта. При помощи жидкостного манипулятора Perkin Elmer Janus® и 96 Kingfisher® (Thermo labsystems, Финляндия, <http://www.thermo.com>) выполняют следующие действия. Супернатант, который содержит ДНК, разбавляют связывающим буфером (150 мкл) и магнитным микроносителем (20 мкл). После сцепления ДНК с микроносителем, выполняют две последовательные промывки (промывочный буфер: промывочный буфер Agowa 1 1/3, этанол 1/3, изопропанол 1/3; промывочный буфер 2: 70% этанола, 30% промывочного буфера Agowa 2) и, наконец, элюируют в элюирующем буфере (100 мкл MQ, 0,025 мкл Tween).

В результате измельчения десяти семян *S. lycopersicum* можно получить достаточно ДНК для насыщения магнитного микроносителя, таким образом, получив высокоомогенные и сопоставимые концентрации ДНК всех образцов. Путем сравнения маркеров лямбда ДНК, выполняют оценку концентрации 30 нг/мкл для каждого образца. Дважды разбавленную ДНК 4-кратно объединяли для высадки секциями. Для целей анализа по выявлению мутаций использовали 2 мкл пула ДНК в мультиплексных ПЦР.

Анализ кривых плавления с высоким разрешением (ПВР) зарекомендовал себя в качестве чувствительного и высокоэффективного метода анализа человеческого и растительного генетического материала. ПВР представляет собой ферментативную технологию скрининга. В ходе окраски при ПЦР-амплификации (краситель LCgreen Plus+, Idaho Technology Inc., Юта, США) молекулы включаются между каждой соединенной парой оснований двухнитевой молекулы ДНК. При попадании в молекулу, краситель светится флуоресцентным светом на 510 нм после возмущения на 470 нм. Камера флуоресцентного детектора (LightScanner, Idaho Technology Inc., Юта, США) фиксирует интенсивность флуоресценции, в то время как ДНК поступательно нагревают. При достижении температуры, которая зависит от стабильности специфичных к последовательности спиралей ДНК, двухнитевый продукт ПЦР начинает плавиться, выделяя краситель. В результате выделения красителя снижается флуоресценция, которая фиксируется в виде кривой плавления флуоресцентным детектором. Группы, которые содержат мутации, в смеси фрагментов после ПЦР образуют двойные гетеро-спирали. Их определяют на основе кривых разницы температур в сравнении с двойными гомо-спиралями.

Праймеры, которые используют для амплификации фрагментов генов для целей ПВР, разрабатывают с использованием программного обеспечения (праймер 3, <http://primer3.sourceforge.net/>). Длина продукта амплификации находится в диапазоне от 200 до 400 пар оснований. Качество праймеров определяют на основе испытания с проведением реакции ПЦР, в результате которой должен быть получен один продукт.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для амплификации фрагментов генов может выполняться следующим образом. 10 нг геномной ДНК смешивают с 4 мкл реакционного буфера (5× реакционного буфера), 2 мкл красителя 10×LC ((LCGreen+ краситель, Idaho Technology Inc., Юта, США), по 5 пмоль прямого и обратного праймера, 4 нмоль дНТФ (Life Technologies, Нью-Йорк, США) и 1 единицей ДНК-полимеразы (ДНК-полимераза Hot Start II), общим объемом 10 мкл. Условия реакции были следующими: 30 с 98°C, затем 40 циклов по 10 с. 98°C, 15 с 60°C, 25 с 72°C и, наконец, 60 с при 72°C.

Присутствие конкретной мутации в отдельных растениях подтверждается повторным проведением ПВР в отношении ДНК из отдельных партий семян M2 идентифицированной соответствующей группы ДНК. В случаях, когда присутствие мутации на основе профиля ПВР подтверждено одним из четырех образцов отдельных семейств ДНК M2, фрагменты ПЦР упорядочиваются с тем, чтобы определить мутацию в гене.

После определения мутации, можно прогнозировать последствия данной мутации, например, при помощи программного обеспечения для выявления консервативных белковых доменов, например, для аннотации функциональных единиц в белках может использоваться база данных консервативных доменов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>). Домены могут рассматриваться в качестве характерных функциональных и/или структурных единиц белка. Домены зачастую определяются как рекуррентные (консервативные) последовательности или структурные единицы, которые могут быть представлены в различном контексте. Модификации консервативных аминокислот в консервативных доменах чаще приводят к влиянию на активность белка, чем аминокислоты, в которых варьируются гомологичные белки, имеющие различное происхождение (виды, роды или семейства).

Семена семейств M2, которые содержат мутации с прогнозируемым влиянием на активность белка, высеивают для целей фенотипического анализа растений. Гомозиготные мутанты выбраны или получены после самоопыления и последующей селекции. После этого определяют влияние мутации на соответствующие белки и фенотип растения, например, при помощи способов, описанных ниже по тексту.

Пример 3.

Характеристика прочности плодов томатов по настоящему изобретению./

Семена дикого типа сорта Тара и мутантов W203* в аналогичном генетическом окружении высеивают

вали, и сеянцы выращивали в стандартных условиях роста в теплице. По каждому генотипу выращивали шесть растений; мутант W203* с наличием гомозиготных и гетерозиготных мутаций, а также растения без мутаций (азиготные), все из которых были получены из того же самого мутантного семейства M2 и растений дикого типа.

По каждому растению были выбраны три сопоставимые группы томатов. Каждая группа была маркирована цветом, который обозначал возраст группы; самая старая группа (№ 1) была обозначена желтым, вторая по возрасту группа (№ 2) - синим, а третья по возрасту группа (№ 3) - красным цветом. 3-й и 4-й томат из каждой группы был отобран для измерения твердости. Таким образом, по каждому растению контролировали шесть томатов. В случае с каждым из томатов фиксировали дату достижения стадии бланжевой спелости (разрушение хлорофила), оранжевая стадия и стадия достижения полностью красной окраски, а также выполняли классификацию в соответствии с требованиями Министерства сельского хозяйства США (1997 г.) Цвет томата обозначает стадию развития и, соответственно, для определения (диапазона) цвета(ов), которые характерны для стадии созревания (см. таблицу), использовалась цветовая таблица (Королевское садоводческое общество, 2007 г.) Томаты на стадии бланжевой спелости обозначали белым цветом на междоузлии. Каждые 2 дня выполняли проверку популяции на достижение плодами стадии бланжевой спелости. Сбор плодов для измерений выполняли в день, когда они становились полностью красными.

Стадию созревания томатов определяют на основании цвета томата (цветовая таблица Королевского садоводческого общества, 2007 г.)

Этап созревания томатов	Цветовой код(-ы)
Зеленовато-бурая окраска	144B
Бланжевая спелость	N144D
Оранжевая окраска	N163C/D
Полностью красная окраска	44A/B

Собранные томаты хранили при комнатной температуре (22-24°C) до момента измерений, которые проводили через 0, 7, 14 или 21 день. Твердость определяли при помощи одноколонных настольных испытательных систем (Instron, ид. № системы: 3342L2018, динамометрический датчик, модель 2519-104) и программного обеспечения Bluehill (Instron, 825 Университи Авеню, Норвуд, Массачусетс 02062-2643, США). Каждое измерение выполняют один раз на плод и при этом таким образом, чтобы избежать повреждения плода. Плод томата сжимали между двумя плоскими стальными пластинами с увеличением усилия от 0,1 (Н) до 4 (Н). Прочность измеряли в виде силы (Н), которая необходима для сжатия плодов на миллиметр, с использованием динамометрического датчика Instron.

Твердость плода измеряли в день приобретения плодом полностью красной окраски (0 дней после приобретения полностью красной окраски) или через 7, 14 или 21 день после приобретения полностью красной окраски. Результаты представлены в таблице. Соответственно, было установлено, что растения с мутантным *асо4* (растения с *асо4/асо4*) дают плоды повышенной твердости на 21 день после приобретения полностью красной окраски по сравнению с плодами, которые дают азиготные растения (растения АСО4/АСО4) (параметрический t-критерий Стьюдента $P < 0,05$).

Также было установлено, что размер плодов, которые дают растения с мутантным *асо4*, существенно не отличается от плодов, которые дают азиготные растения; см. фиг. 2 (параметрический t-критерий Стьюдента $P = 0,84$).

В конечном счете было установлено, что время между стадией бланжевой спелости и стадией полностью красной окраски у плодов, которые дают растения с мутантным *асо4*, существенно не отличается от плодов, которые дают азиготные растения; см. фиг. 3 (параметрический t-критерий Стьюдента $P = 0,35$).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение вида *Solanum lycopersicum*, содержащее в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена АСО4 дикого типа, причем указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена АСО4 дикого типа; и/или причем мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа; и причем ген АСО4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, причем мутантный аллель при его нахождении в гомозиготной форме приводит к получению плодов, обладающих повышенной твердостью плода после вступления плода в стадию полностью красной окраски.

2. Растение по п.1, отличающееся тем, что растение является гомозиготным по мутантному аллелю.

3. Растение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что мутантный аллель ко-

дирует белок, который является укороченным по сравнению с белком дикого типа.

4. Растение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что указанные плоды, обладающие повышенной твердостью плода после вступления плодов в стадию полностью красной окраски, обладают нормальной прочностью плодов и/или нормальным созреванием до достижения стадии полностью красной окраски.

5. Растение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что растение является инбридным растением, дигаплоидным растением или гибридным растением.

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

7. Часть растения по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что указанная часть растения содержит в своем геноме по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена ACO4 дикого типа, как определено в п.1 или 3.

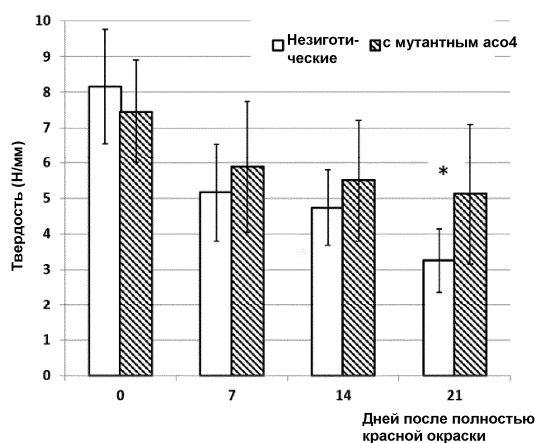
8. Часть растения по п.7, причем указанная часть растения является плодом, листом, пыльником, пестиком, стеблем, черешком, корнем, семяпочкой, пыльцой, протопластом, тканью, семенем, цветком, семядолей, гипокотилем, зародышем или клеткой.

9. Способ получения плодов томата с увеличенным сроком хранения, причем указанный способ включает выращивание растения по любому из пп.1-5, а также сбор плодов, произведенных указанными растениями.

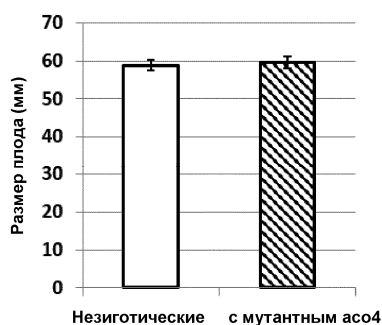
10. Способ идентификации растения или части растения вида *Solanum lycopersicum*, содержащих аллель, который при его нахождении в гомозиготной форме приводит к получению плодов, обладающих повышенной твердостью плода после вступления плода в стадию полностью красной окраски, причем способ включает определение того, содержит ли растение или часть растения мутантный аллель гена ACO4, где указанный мутантный аллель приводит к снижению экспрессии или отсутствию экспрессии гена ACO4 дикого типа, или где мутантный аллель кодирует белок со снижением функции или потерей функции по сравнению с белком дикого типа, и причем ген ACO4 дикого типа кодирует белок, содержащий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что дополнительно включает отбор растения или части растения, содержащих по меньшей мере одну копию мутантного аллеля гена ACO4.

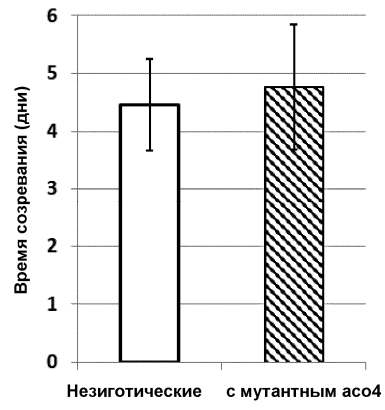
12. Способ по п.10 или 11, отличающийся тем, что растение или часть растения подвергают этапу индуцирования мутаций перед определением того, содержит ли растение или часть растения мутантный аллель гена ACO4.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

