



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.08.31

(21) Номер заявки
201291466

(22) Дата подачи заявки
2011.05.27

(51) Int. Cl. *A01H 5/00* (2006.01)
A01H 5/08 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) РАСТЕНИЯ С УВЕЛИЧЕННЫМ РАЗМЕРОМ ПЛОДА

(31) 10005603.5

(32) 2010.05.28

(33) EP

(43) 2013.05.30

(86) PCT/EP2011/058731

(87) WO 2011/147968 2011.12.01

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

(72) Изобретатель:
**Фризен Хендрик Виллем, Мариани
Челестина (NL), Дэ Ёнг Маайке (GB)**

(74) Представитель:
Беляева Е.Н. (BY)

(56) DATABASE EMBL [Online], 26 May 2010 (2010-05-26), Lu G., Wu J.: "Solanum lycopersicum cultivar Zhongshu No.6 auxin response factor 9 (ARF9) mRNA, complete cds.", XP002605507, retrieved from EBI accession no. EMBL:HM037250, Database accession no. HM037250, the whole document

DATABASE EMBL [Online], 12 May 2004 (2004-05-12), "Lycopersicon esculentum clone 132441R, mRNA sequence", XP002605508, retrieved from EBI accession no. EMBL:BT013639, Database accession no. BT013639, cited in the application, the whole document

DE JONG MAAIKE ET AL.: "The Solanum lycopersicum auxin response factor 7 (SIARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set

and development", PLANT JOURNAL, vol. 57, no. 1, 7 October 2008 (2008-10-07), pages 160-170, XP002605509, ISSN: 0960-7412, cited in the application, abstract; pages 161, 163, figure 1

WANG ET AL.: "Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in rice (Oryza sativa)", GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL LNKD- DOI:10.1016/J.GENE.2007.01.006, vol. 394, no. 1-2, 20 April 2007 (2007-04-20), pages 13-24, XP022060277, ISSN: 0378-1119, cited in the application, abstract; pages 14, 22, 23; figure 4

JONES BRIAN ET AL.: "Down-regulation of DR12, an auxin-response-factor homolog, in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark green and blotchy ripening fruit", PLANT JOURNAL, vol. 32, no. 4, November 2002 (2002-11), pages 603-613, XP002605510, ISSN: 0960-7412, cited in the application, abstract; pages 604, 607; figure 1

OKUSHIMA YOKO ET AL.: "Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: Unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19", PLANT CELL, vol. 17, no. 2, February 2005 (2005-02), pages 444-463, XP002605511, ISSN: 1040-4651, cited in the application, abstract; pages 445, 446; figure 2

WO-A2-2005001050

ROBERTS D.R. ET AL.: "ARF9 and the gravity persistent signal response", GRAVITATIONAL AND SPACE BIOLOGY BULLETIN, vol. 20, no. 2, June 2007 (2007-06), pages 103-104, XP002605512, cited in the application, the whole document

(57) Изобретение относится к области трансгенных и нетрансгенных растений с новыми фенотипами. В изобретении предложены белки Solanum lycopersicum фактора 9 ответа ауксина (SIARF9) и кодирующие их последовательности нуклеиновых кислот, которые пригодны в придании новых фенотипов растениям, в частности увеличенного размера плодов.

Область изобретения

Изобретение относится к области биотехнологии и селекции растений. В изобретении предложены растения с увеличенным размером плодов, в частности растения томатов (*Solanum lycopersicum*) с увеличенным размером и массой плода, и способы получения генетически модифицированных или мутантных растений, производящих плоды большего размера. Настоящее изобретение предлагает новый вариант использования гена, именуемого SlARF9, кодирующего белок SlARF9, который является отрицательным стабилизатором клеточного деления во время развития плода. Понижающая регуляция, модификация или сайленсинг гена SlARF9 приводят к получению растений, имеющих значительно увеличенные плоды на последнем этапе фазы роста плодов. Плоды становятся крупнее благодаря ускоренному клеточному делению тканей перикарпия, что ведет к крупным плодам с большим количеством клеток (и, таким образом, более высоким содержанием целлюлозы, геми-целлюлозы, пектина и т.д.). Также в настоящем изобретении предложены растения, семена, плоды и части растений, содержащие мутантный аллель SlARF9 (обозначенный в настоящем документе как slarf9) в их геноме и имеющие значительно более крупные плоды на последнем этапе фазы роста плодов в результате мутации(й) в аллеле(ях) slarf9. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагаются способы для создания или определения растений, содержащих одну или более мутантных аллелей slarf9 в своем геноме.

Предпосылки к созданию изобретения

Ангиоспермы, цветущие растения являются крупнейшей группой наземных растений. В ангиоспермах плодolistик является женским органом размножения, видоизмененным в рыльце, пестик и завязь, окружающую семяпочку. После успешного завершения опыления и оплодотворения семяпочка развивается в семена, а завязь - в плод. Трансформация из завязи в быстро растущий плод включает молекулярные, биохимические и структурные изменения, которые должны быть тесно скоординированы. В зависимости от фазы развития плодов временная и пространственная структура данных изменений осуществляется благодаря фитогормонам, таким как ауксин, гиббереллин, цитокинин, абсцизовая кислота и этилен. Еще в начале 20 века было установлено, что ауксин и гиббереллин также являются важными факторами в начале развития плодов. Тем не менее, сложная регуляторная сеть, контролируемая данными гормонами, до сих пор остается до конца не изученной.

"Завязывание плода" определяется как переход покоящейся завязи в быстро растущий молодой плод, что является важным процессом полового размножения цветковых растений. Томат обыкновенный (*Solanum lycopersicum* L.) является одним из наиболее изученных мясистых плодов, представляющий Solanaceae, семейство, которое включает несколько других важных культур, таких как баклажан (*Solanum melongena* L.) и перцы (*Capsicum* spp.). Биология томата является наиболее подходящей. У томата достаточно короткий жизненный цикл, он не требует особых условий для выращивания и, хотя является самоопылителем, он легко поддается перекрестному опылению. Более того, доступен широкий спектр генетических ресурсов, таких как фенотипические дивергентные сорта, перекрестные дикорастущие члены семейства, мутанты, а также геномные инструменты (Mueller et al., *Plant Physiology* 138, 1310-1317; Mueller et al., *Comparative and Functional Genomics* 6, 153-158), такие как библиотеки БПЗ и маркеры экспрессируемой последовательности (EST).

Завязывание плода томата очень чувствительно к условиям окружающей среды, в частности к слишком низким или слишком высоким температурам, влияющим на развитие пыльца и раскрытие пыльника. Adams et al. (2001, *Annals of Botany* 88, 869-877) показал, что режим постоянной температуры 14 или 26°C ведет к значительному сокращению завязи плодов томата по сравнению с режимом 22°C. Тем не менее, оптимальная температура роста может отличаться в зависимости от сорта. В результате подобной температурной чувствительности эффективное производство томатов ограничено определенными климатическими зонами. Поэтому компании, производящие семена томатов, выращивают их в разных частях света для развития сортов, подходящих для оптимального производства плодов в местных климатических условиях. Тем не менее, даже с учетом оптимизированных условий часто не представляется возможным выращивать томаты в летний период в теплых регионах, таких как юг Европы. В более северных регионах выращивание томатов возможно только в теплый период и только в современных теплицах, затрачивая при этом огромное количество энергии для их отопления.

Завязь плода зависит от успешного завершения опыления и оплодотворения (Gillaspy et al., 1993, *The Plant Cell* 5, 1439-1451). Когда в период цветения цветок томата полностью раскрывается, совместимая пыльца должна прорасти на пестике и образовывать пыльцевую трубку. Затем данная пыльцевая трубка прорастает через пестик и овулярный семяход для доставки двух сперматогенных клеток в зародышевый мешок. Происходит двойное оплодотворение; одна из двух сперматогенных клеток оплодотворяет яйцеклетку, в то время как вторая связывается с двумя гаплоидными полярными ядрами в главной клетке. Следовательно, как зародыш, так и окружающие ткани могут генерировать сигналы, стимулирующие рост плода. Завязь томата состоит из двух или больше плодolistиков, которые окружают разделенные полости, содержащие семязачатки. После успешного оплодотворения развитие семязачатка в плод начинается в период клеточного деления, которое продолжается от 10 до 14 дней. В течение следующих 6-7 недель роста плода зависит, в основном, от роста клеток (Mapelli et al., 1978, *Plant and Cell Physiology* 19, 1281-1288; Büniger-Kibler and Bangerth, 1982, *Plant Growth Regulation* 1, 143-154; Gillaspay et

al., 1993, *supra*). Плодолистик развивается в перикарпий, а плацента, с которой соединены семяпочки, развивается в гелеобразное вещество, состоящее из больших тонкостенных клеток, которые являются высоко вакуолизированными. В конце периода роста клетки плод достигает своего конечного размера и начинает созревать (Gillaspy et al., 1993, *supra*). Различают шесть стадий спелости: неспелый, спелый, спелый зеленый, молочный, розовый и красный. Созревшие томаты обычно собирают на красной стадии, в то время как томаты для продажи в свежем виде собираются раньше, либо на молочной стадии (когда не требуется обработка этиленом для созревания до красной стадии), либо на зеленой стадии (когда такая обработка необходима).

Несмотря на то что влияние на развитие плода таких фитогормонов, как ауксин и гиббериллин, было известно уже в начале 20 века (Gustafson, 1937, *American Journal of Botany* 24, 102-107; Gustafson 1939 *American Journal of Botany* 26, 135-138; Wittwer et al., 1957, *Plant Physiology* 32, 39-41), молекулярные механизмы, лежащие в основе завязывания плода, до сих пор в основном неизвестны и в настоящее время начинают осознаваться.

Ауксин действует как необходимый регулятор в большом количестве процессов развития в течение жизненного цикла растения, воздействуя на многие гены (Theologis, 1986, *Annual Reviews of Plant Physiology* 37, 407-438). Подобная управляемая ауксином генная экспрессия контролируется двумя семействами факторов транскрипции, факторами реакции ауксина (ARF) и ауксин/индол-3-уксусные кислоты (Aux/IAAs), которые представлены двумя большими семействами генов растительного вида, такими как арабидопсис и рис (Hagen and Guilfoyle, 2002, *Plant Molecular Biology* 49, 373-385, *Plant Molecular Biology* 49, 387-400; Liscum and Reed, 2002, *infra*; Wang et al., 2007, *Gene* 394, 13-24). Белки, закодированные этими семействами, имеют два консервативных С-терминальных домена, домены III и IV, выступающие в качестве доменов взаимодействия между Aux/IAA и ARF, которые способствуют взаимодействию ARFs и Aux/IAA с образованием гомо- и гетеродимеров, соответственно (Kim et al., 1997, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94, 11786-11791; Ulmasov et al., 1997, *Science* 276, 1865-1868; Ulmasov et al., 1999, *The Plant Journal* 19, 309-319). Более того, ARF содержит N-терминал В3 производный ДНК-связывающий домен (DBD), который связывает ответные элементы ауксина (AuxRE) на участках промотора, регулируемых ауксином генов (Ulmasov et al., 1999 *supra*), на среднем участке (MR), выполняющем функции транскрипционной активации или репрессивного домена, в зависимости от состава аминокислоты (Ulmasov et al., 1999, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96, 5844-5849; Tiwari et al., 2003, *The Plant Cell* 15, 533-543). Белки Aux/IAA выступают в качестве репрессора путем блокировки транскрипционной активности ARF (Liscum and Reed, 2002, *Plant Molecular Biology* 49, 387-400). Репрессивная активность Aux/IAA придается N-терминальным доменом I (Tiwari et al., 2004, *The Plant Cell* 16, 533 - 543). В последнее время, Szemenyei et al. (2008, *Science* 319, 1384-1386) было установлено, что в нескольких Aux/IAA, данный домен содержит ассоциированный с ERF амфифильный репрессивный (EAR) мотив, использующий TOPLESS (TPL), транскрипционный корепрессор. Дополнительно, Aux/IAA содержит четвертый консервативный участок, домен II (Tiwari et al., 2001, *The Plant Cell* 13, 2809-2822). Ауксин усиливает взаимодействие данного домена и SCFTIR1 комплекса убиквитин-лигаза, содержащего F-бокс ауксиновый рецепторный белок TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT1), что приводит к деградации Aux/IAA, опосредованной убиквитином (Dharmasiri et al., 2005, *Nature* 435, 441-445; Kepinski and Leyser, 2005, *Nature* 435, 446-451; Tan et al., 2007, *Nature* 446, 640-645; dos Santos Maraschin et al., 2009, *The Plant Journal* 59, 100-109). Следовательно, ARF высвобождаются из репрессии, что ведет к транскрипции ауксинных ответных генов (Woodward and Bartel, 2005, *Annals of Botany* 95, 707-735). Однако данная модель поддерживает только функцию транскрипционной активации ARF.

Механизм, с помощью которого репрессоры ARF регулируют экспрессию ауксин-зависимых генов, до сих пор не известен, так как их взаимодействие с Aux/IAA или с активирующими ARF является довольно незначительным (Tiwari et al., 2003, *supra*; Hardtke et al., 2004, *Development* 131, 1089-1100). В противном случае, репрессоры ARF могут конкурировать с активаторами ARF за связывающие участки AuxRE в промоторах ауксин ответных генов, ингибируя экспрессию данных генов независимо от Aux/IAA и предоставляя альтернативный механизм генной регуляции (Guilfoyle and Hagen, 2007, *Plant Biology* 10, 453-460).

В томатах ауксин играет важную роль в завязывании и развитии плода. Iwahori (1967, *Plant and Cell Physiology* 8, 15-22) и Mapelli et al. (1978, *Plant and Cell Physiology* 19, 1281-1288) показал, что после опыления концентрация ауксина в завязи быстро возрастает, достигая максимума на 7-8 день после опыления (DAP). Второй пик активности ауксина наблюдался на 30 день после опыления. Важность ауксина в завязи плодов томата была проиллюстрирована в экспрессии, специфической для завязи, генов *iaaM* или *golB* агробактерии, влияющей на синтез ауксина или ответную реакцию, что привело к образованию бессемянных (партенокарпических) плодов томата (Ficcadenti et al., 1999, *Molecular Breeding* 5, 463-470; Carmi et al., 2003, *Planta* 217, 726-735). Применение ауксина на неопыленные завязи привело к формированию плодов без необходимости в опылении и оплодотворении (Gustafson, 1936, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 22, 628-636; Büniger-Kibler and Bangerth, 1982, *supra*). Обычно в течение первых 10-14 дней (после оплодотворения) развития рост плода томата, в основном, зависит от клеточного деления. В течение следующих 6-7 недель, рост плода во многом зависит от роста клеток (Mapelli et

al., 1978, supra; Bünge-Kibler and Bangerth, 1982, supra; Gillaspay et al., 1993, supra). Тем не менее, в плодах, вызванных ауксин индол-3-уксусной кислотой (IAA) период клеточного деления был короче и длился всего 10 дней, несмотря на то что клеточное деление проходило быстрее, чем в опыленных контрольных плодах. Тем не менее, данные плоды, индуцированные IAA, оставались меньшего размера, по сравнению с контрольными плодами, так как рост клеток замедлялся (Bünge-Kibler and Bangerth, 1982, supra). Обработка синтетическими ауксинами стимулировала клеточное деление на продолжительный период, что привело к формированию плодов с большим числом клеток перикарпия (Bünge-Kibler and Bangerth, 1982, supra; Serrani et al., 2007, *Journal of Plant Growth Regulation* 26, 211-221). Данные результаты предполагают, что на ранних этапах развития плода томата активность клеточного деления строго регулируется ауксином.

Ранее для определения генов, выраженных во время завязывания плода, использовалось транскриптное профилирование, основанное на полиморфизме длины амплифицированных фрагментов кДНК (cDNA-AFLP) (Vriezen et al., 2008, *New Phytologist* 177, 60-76). Один из 874 генов, индуцированных в завязях путем опыления, имел сходство последовательности с арабидопсисом ARF9 (AtARF9), а также учетный номер GenBank BT013639.1 (клон томата с неизвестной генной функцией). Несмотря на не очень высокую аминокислотную идентичность AtARF9 (52% идентичности последовательности с использованием программы парной линейной последовательности Emboss "Needle"), ген был назван SlARF9 (*Solanum lycopersicum* ARF9).

Арабидопсис имеет 23 гена ARF. Предполагается, что AtARF9 вовлечен в гравитропную сигнальную трансдукцию, так как мутантная линия арабидопсиса *arf9*, у которой отсутствует 3' конец транскрипта, слишком остро реагировала после гравитимуляции (Roberts et al., 2007, *Gravitational and Space Biology Bulletin* 20, 103-104). Более того, было установлено, что ген AtARF9 экспрессируется в суспензоре эмбриона арабидопсиса и двойных выбитых линиях, в которых как ARF9, так и ARF13 были заглушены, AtARF9 необходим для контроля за развитием суспензора (Liu et al., 2008, 19th International Conference on Arabidopsis Research, Montreal, Canada). До сих пор единственным известным ARF, участвующим в процессе развития плода, является плод без оплодотворения (FWF)/ARF8, так как мутантные линии *fwf/arf8* образуют партенокарпные стручки (Goetz et al., 2006, *The Plant Cell* 18, 1873-1886). У томатов трансгенные линии с сокращенными транскриптными уровнями SlARF7 также формируют партенокарпные плоды, что указывает на то, что SlARF7 выступает в качестве отрицательного регулятора завязывания плода (de Jong et al., 2009, *The Plant Journal* 57, 160-170). Другим единственным описанным в настоящее время членом семейства томатов ARF является развитый регулируемый ген 12 (DR12), гомолог AtARF4. Уровни мРНК DR12 увеличивались в процессе развития плода и достигли высшего уровня на ранней красной стадии плода. С помощью антисмыслового подхода понижающая регуляция данного гена воздействовала на твердость плода на красной стадии (Jones et al., 2002, *The Plant Journal* 32, 603-613).

Несмотря на то что сходство последовательности SlARF9 с AtARF9 может предположить, что данные гены теоретически могут быть ортологами (несмотря на то что сходство последовательности несущественно) согласно настоящему изобретению SlARF9 выполняют совершенно другую функцию в отличие от AtARF9 и экспрессируется в другие ткани. Создатели настоящего изобретения установили, что ген SlARF9 кодирует белок фактора транскрипции, что отрицательно отражается на делении клеток в период роста плода. На трансгенных томатах, у которых транскриптный уровень SlARF9 мРНК сократился за счет РНК-интерференции (сайленсинга генов), появлялись более крупные и тяжелые плоды по сравнению с диким типом контрольных линий. Для сравнения, сверхэкспрессирующие линии SlARF9 имели плоды меньшего размера и меньшей массы, чем дикорастущие. Кроме того, количество клеток и клеточных слоев в перикарпии значительно возросло в плодах SlARF9-RNA-интерференции, по сравнению с дикими типами плодов. Более крупные плоды с большим количеством меньших клеток имеют преимущество не только в увеличении урожайности, но и твердости компонентов (клеточных оболочек, содержащих пектин, геми-целлюлозу и целлюлозу).

Общие определения

Термин "последовательность нуклеиновой кислоты" (или молекула нуклеиновой кислоты) относится к молекуле ДНК или РНК в одной или двухцепочной форме, в частности ДНК, кодирующей белок или фрагмент белка согласно данному изобретению. "Изолированная последовательность нуклеиновой кислоты" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая больше не находится в природной среде, из которой она была выделена, например последовательности нуклеиновой кислоты в бактериальной клетке-реципиенте или в растительном ядерном или пластидном геноме.

Термины "белок" или "полипептид" являются взаимозаменяемыми и относятся к молекулам, состоящим из цепочки аминокислот, независимо от конкретного способа действия, размера, 3-мерной структуры и происхождения. "Фрагмент" или "часть" белка SlARF9, таким образом, может еще называться "белком". "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.

Термин "ген" означает последовательность ДНК, содержащую участок (участок транскрипции), ко-

торый записан в молекуле РНК (например, мРНК или молекуле РНКи) в клетке, функционально связанной с подходящими регулируемым участками (например, промоторами). Ген может, таким образом, состоять из нескольких функционально связанных последовательностей, таких как промотор, 5 лидерная последовательность, включающая, например, последовательности, участвующие в инициации трансляции, а (белок) кодирующий участок (кДНК или геномной ДНК), а также 3'нетранслируемую последовательность, включающую например, сайты терминации транскрипции.

"Химерный ген" (или рекомбинантный ген) относится к любому гену, который обычно не встречается в природе в видах, в частности генах, в которых одна или несколько частей последовательности нуклеиновых кислот присутствуют, которые не связаны друг с другом в природе. Например, промотор не связан в природе с частью или целым транскрибируемым участком или с другим регуляторным участком. Термин "химерный ген" подразумевает включение экспрессии конструкции, в которых промотор или транскрипция регуляторной последовательности функционально связана с одной или несколькими кодирующими последовательностями или антисмысловой (обратным дополнением к смысловой нити) или последовательностью обращенных повторов (смысл и антисмысл, посредством чего РНК транскрипт формирует двухцепочную РНК на транскрипции). "Цис-ген" - это химерный ген, предпочтительно все последовательности генов, по меньшей мере, транскрибируемая последовательность, растительного вида, совместимого для размножения с видом, в который введен ген.

"Экспрессия гена" означает процесс, в котором ДНК участок, который функционально связан с соответствующими регулирующими участками, в частности промотором, транскрибируется в РНК, которая является биологически активной, т.е. которая 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. В подходах сайленсинга генов ДНК последовательность предпочтительно присутствует в виде ДНК антисмысловых или инвертированных ДНК повторах, состоящих из короткой последовательности гена-мишени в антисмысловой или в смысловой и антисмысловой ориентации (инвертированный повтор). "Эктопическая экспрессия" относится к экспрессии в тканях, в которых ген, как правило, не выражен.

"Активный белок" или "функциональный белок" - это белок, который имеет активность белка, измеримой в искусственных условиях, например, при анализе активности в искусственных и/или в естественных условиях, например, по фенотипу, предоставляемому белком. Белок "дикого вида" представляет собой полностью функциональный белок, представленный в диком виде растений. "Мутантный белок" - это белок, включающий одну или несколько мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белки, причем мутация приводит к (мутантных молекул нуклеиновой кислоты кодирования) "ограничению функций" или "потере функций" белка, как, например, измеримых активностью белка в искусственных условиях по сравнению с активностью белка дикого вида, например в анализе активности и/или в естественных условиях, например по фенотипу предоставляемых мутантным аллелем.

"Мутация" в молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, представляет собой изменение одного или нескольких нуклеотидов по сравнению с диким типом последовательности, например, путем замены, удаления или вставки из одного или нескольких нуклеотидов. "Точечная мутация" заключается в замене одного нуклеотида, или вставке или удалении одного нуклеотида.

"Несмысловая" мутация - это (точечная) мутация в последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих белок, в результате чего кодон превращается в терминирующий кодон. Это приводит к преждевременному терминирующему кодону, присутствующему в мРНК и в усеченном белке. Усеченный белок, возможно, имеет сниженную функцию или потерю функции.

"Миссенс" мутация - это (точечная) мутация в последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих белок, в результате чего кодон меняют для кодирования различных аминокислот. Полученный белок, возможно, имеет сниженную функцию или потерю функции.

"Сплайс-сайт" мутация - это мутация в последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих белок, в результате чего РНК сплайсинг пре-мРНК изменяется, что приводит к мРНК, имеющей различные нуклеотидные последовательности и белку, имеющему различные последовательности аминокислот по сравнению с диким видом. Полученный белок, возможно, имеет сниженную функцию или потерю функции.

Мутация "сдвига рамки" - это мутация последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих белки, в которых рамки считывания мРНК изменены, что ведет к различным последовательностям аминокислот. Полученный белок, возможно, имеет сниженную функцию или потерю функции.

Мутация в регуляторной последовательности, например, в промоторе гена, - это изменение одного или нескольких нуклеотидов, по сравнению с диким видом последовательности, например, путем замены, удаления или вставки из одного или нескольких нуклеотидов, что приводит, например, к снижению или к отсутствию мРНК транскрипта полученного гена.

"Сайленсинг" относится к понижающей регуляции или полному ингибированию экспрессии гена гена-мишени или семьи генов.

"Ген-мишень" в подходах сайленсинга генов - это ген или семья генов (или один или несколько конкретных аллелей гена), из которых эндогенная экспрессия гена подавляется или полностью замедляется (подавляется), когда химерный ген сайленсинга (или "химерный ген РНК-интерференции") выражается, например, и производит сайленсинг РНК транскрипта (например, дсРНК или петля РНК способны к сайленсингу эндогенной экспрессии гена-мишени). В подходах мутагенеза, ген-мишень является эндогенным геном, который должен мутировать, что приводит к изменению (снижению или потере) экспрессии генов или изменения (снижения или потери) функции кодируемого белка.

"Смысловой" РНК транскрипт, как правило, получен путем соединения промотора в двухцепочную молекулу ДНК, в которой смысловая нить (кодирующая цепь) молекулы ДНК в 5' к 3' ориентации, так что при транскрипции РНК смысл транскрибируется, который имеет одинаковую последовательность нуклеотидов в смысловой ДНК нити (за исключением того, что Т заменяется U в РНК). "Антисмысловый" РНК транскрипт, как правило, получен путем соединения промотора в комплементарную нить (антисмысловую нить) смысловой ДНК, таким образом, при транскрипции антисмысловая РНК транскрибируется.

"Транскрипция регуляторной последовательности" здесь определяется как последовательность нуклеиновой кислоты, которая способна регулировать скорость транскрипции (кодирования) последовательности, функционально связанной с транскрипцией регуляторной последовательности. Транскрипция регуляторной последовательности, как определено в данном документе, таким образом, включает в себя все последовательности элементов, необходимых для инициации транскрипции (элементов промотора), для поддержания и регулирования транскрипции, включая, например, ослабители и усилители. Хотя, главным образом, растущая (5') транскрипция регуляторных последовательностей в кодирующей последовательности относится к регуляторной последовательности, обнаруженной в снижении (3') кодирующей последовательности, также подпадает под это определение.

Используемый здесь термин "промотор" относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, которая контролирует транскрипцию одного или нескольких генов, расположенных выше по отношению направлению транскрипции инициации транскрипции участка гена, и структурно определен наличием участков, связывающих ДНК-зависимую РНК-полимеразу, участки инициации транскрипции и любые другие последовательности ДНК, в том числе, но не ограничиваясь транскрипционными факторами участков связывания, репрессора и активатора связывания участков белка и любой другой последовательности, известному одной из способностей в уровне техники, чтобы прямо или косвенно регулировать количество транскрипции промотора. "Конститутивный" промотор - это промотор, активный в большинстве тканей в самых физиологических и развивающихся условиях. "Индукцируемый" промотор - это промотор, который физиологически (например, наружное применение некоторых соединений) или эволюционно регулируется. "Тканеспецифичный" промотор действует только в определенных типах тканей или клеток. "Тканепредпочтительный" промотор действует в определенных тканях (например, в развивающихся тканях плода), однако он также может действовать и в других тканях.

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, транскрипция регуляторной последовательности, функционально связан с кодирующей последовательностью, если это влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. Функционально связан означает, что ДНК последовательности, будучи связанными, как правило, являются смежными и, при необходимости, объединяют два участка кодирования белка, смежных и в рамке считывания, чтобы произвести "химерный белок". "Химерный белок" или "гибридный белок" представляет собой белок, состоящий из различных белков "доменов" (или мотивов), который не был найден в качестве такового в природе, но который был объединен для формирования функционального белка, который показывает функциональность присоединенных доменов. Химерный белок также может быть гибридным белком двух или более белков, встречающихся в природе.

Термин "домен", используемый в настоящем документе, означает любую часть (части) или домен(ы) белка с определенной структурой или функцией, которые могут быть переданы другому белку для обеспечения нового гибридного белка, по крайней мере, с функциональной характеристикой домена. Конкретные домены могут также быть использованы для идентификации представителей белков, принадлежащих к группе белков SlARF9, таких как варианты SlARF9 томата или ортологи SlARF9 других видов растений. Примеры доменов, найденных в белках SlARF9, - это полученный из В3 ДНК-связывающий домен, который включает в себя примерно 74-236 аминокислот из SEQ ID NO: 2 или ее вариантов, средний участок (MR), который включает в себя примерно 237-564 аминокислот из SEQ ID NO: 2 или ее вариантов, ответный участок ауксина, который включает в себя примерно 256-332 аминокислот из SEQ ID NO: 2 или ее вариантов, домены димеризации III или IV, которые включают в себя примерно 565-602 или 609-651 аминокислот из SEQ ID NO: 2, соответственно, либо ее варианты.

Термины "пептид-мишень" относятся к аминокислотным последовательностям, которые нацелены на белки внутриклеточных органелл, таких как пластыды, предпочтительно хлоропласты, митохондрии, или в межклеточное пространство (секрецию сигнального пептида). Последовательность нуклеиновой

кислоты, кодирующая пептид-мишень, может быть объединена (в рамке) в последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую терминальный конец аминокислоты (N-терминальный конец) белка.

"Конструкт нуклеиновой кислоты" или "вектор" в данном документе подразумеваются как искусственные молекулы нуклеиновой кислоты, которые получены в результате использования технологии рекомбинантной ДНК и которые используются для доставки экзогенной ДНК в клетку-реципиента. Основной вектор может быть, например, двоичным или супербинарным вектором (см. прим. US 5591616, US 2002138879 и WO 9506722), совместной интеграции вектора или Т-ДНК вектора, как известно в уровне техники и в данном документе, в который интегрирован химерный ген, или, если подходящая транскрипция регуляторной последовательности уже существует, только желаемая последовательность нуклеиновых кислот (например, кодирующая последовательность, антисмысловая или последовательность инвертированного повтора) интегрирована на выходе транскрипции регуляторной последовательности. Векторы обычно включают дальнейшие генетические элементы, чтобы облегчить их использование в молекулярном клонировании, такие как, например, селективируемые маркеры, несколько сайтов клонирования и т.п. (см. ниже).

"Клетка-хозяин" или "рекомбинантная клетка-хозяин" или "трансформированная клетка" - это термины, относящиеся к новой отдельной клетке (или организму), возникающей в результате по крайней мере из одной молекулы нуклеиновой кислоты, особенно содержащей химерный ген, кодирующий желаемый белок или последовательность нуклеиновых кислот, которые при транскрипции уступают антисмысловой РНК или РНК инвертированного повтора (или шпильки РНК) для сайленсинга целевого гена/семьи генов были введены в указанные клетки. Клетка-хозяин - это предпочтительно растительная клетка или бактериальная клетка. Клетка-хозяин может содержать конструкт нуклеиновой кислоты в качестве экстра-хромосомной (эписомной) репликации молекул, или, более предпочтительно, включает в себя интегрированный химерный ген в ядерном или плазмидном геноме клетки-хозяина.

Термин "селективируемый маркер" - это термин подобен одному из обычных нововведений в уровне техники и используется здесь для описания любого генетического объекта, который, будучи выраженным, может быть использован, чтобы выбрать клетку или клетки, содержащие селективный маркер. Селективируемый маркер генных продуктов придает, например, устойчивость к антибиотикам, или, еще лучше, устойчивость к гербицидам или иным селективируемым свойствам, таким как фенотипическое свойство (например, изменение пигментации) или потребности в питании. Термин "репортер" в основном используется для обозначения видимых маркеров, таких как зеленый флуоресцентный белок (GFP), eGFP, люцифераза, GUS и т.д.

Термин "ортолог" гена или белка относится здесь к гомологичному гену или белку, найденному в другом виде, который имеет ту же функцию, что и ген или белок, но (обычно) разделившиеся в последовательности с момента времени, когда виды, скрывающие ген, разделяются (т.е. гены эволюционировали от общего предка при помощи видообразования). Ортологи гена томатов *SlARF9*, таким образом, можно определить и в других видах растений, основанных на последовательности сравнений (например, на основе процентной идентичности последовательности по всей последовательности и/или во всех определенных доменах) и/или функциональном анализе.

Термины "гомологичный" и "гетерологичный" относятся к взаимодействию между нуклеиновой кислотой или последовательностью аминокислоты и ее клетки-хозяина или организма, особенно в контексте трансгенных организмов. Гомологичная последовательность, таким образом, найдена в естественных условиях в видах хозяев (например, в растении томата, преобразованного геном томата), а гетерологичная последовательность найдена в естественных условиях в клетке-хозяине (например, растение томата преобразовано последовательностью из растения картофеля). В зависимости от контекста термин "гомолог" или "гомологичный" альтернативно может относиться к последовательностям, которые являются потомками от общей последовательности предков (например, они могут быть ортологами).

"Жесткие условия гибридизации" могут быть использованы для идентификации нуклеотидных последовательностей, которые существенно идентичны данной нуклеотидной последовательности. Жесткие условия зависят от последовательности и будут отличаться в различных обстоятельствах. Обычно жесткие условия следующие: 5°C ниже точки плавления (T_m) для определенной последовательности под определенной ионной прочностью и рН. T_m - это температура под определенной ионной прочностью и рН, при которой 50% целевой последовательности гибридизует в идеально подходящий экземпляр. Обычно строгие условия будут выбраны таким образом, что концентрация солей составляет около 0,02 молярной при рН 7 и температуре менее 60°C. Снижение концентрации соли и/или повышение температуры увеличивает точность. Жесткие условия для РНК-ДНК гибридизации (Нозерн-блоттинг, используя, например, 100-й образец) - это, например, те, которые включают, по крайней мере, одну промывку в $0,2 \times SSC$ при 63°C в течение 20 мин, или эквивалентных условиях. Жесткие условия для РНК-ДНК гибридизации (Southern blots, используя, например, 100-й образец) - это, например, те, которые включают, по крайней мере, одну промывку (обычно 2) в $0,2 \times SSC$ при температуре, по крайней мере, 50, обычно при 55°C, в течение 20 мин или эквивалентных условиях. См. также Sambrook и др. (1989) и Sambrook и Russell (2001).

"Идентичность последовательности" и "сходство последовательности" можно определить выравниванием двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с использованием глобальных или локальных алгоритмов выравнивания. Последовательности могут затем считаться "практически идентичными" или "весьма подобными", когда они (оптимально выровнены, например, программой GAP или BESTFIT или фильтрующей программой "Needle" (с использованием параметров по умолчанию, см. ниже) разделяют, по крайней мере, определенный минимальный процент идентичности последовательности (как определено ниже). Эти программы используют глобальный алгоритм выравнивания Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей длине, получая максимальное количество совпадений и сводя к минимуму количество пробелов. Обычно параметры по умолчанию используются с пробелом создания разрыва = 10 и пробелом расширения разрыва = 0,5 (как для нуклеотидного, так и белкового выравнивания). Для нуклеотидов используемый подсчет значений матрицы по умолчанию - это *nwsgapdna* и для белков подсчет значений матрицы по умолчанию - это *Blosum62* (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Выравнивания последовательности и показатели процентной идентичности последовательности, например, могут быть определены с помощью компьютерных программ, таких как пакет GCG Висконсин, версия 10.3, доступных из Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA or EMBOS (http://www.ebi.ac.uk/Tools/webservices/services/emboss). Альтернативно сходство процентов или идентичность могут быть определены с помощью функции поиска в базах данных, таких как FASTA, BLAST и т.д., но совпадения должны быть получены и приведены в соответствие попарно, чтобы сравнить идентичность последовательности.

В данном документе и его формуле глагол "содержать" и его конъюгации используются в неограниченном смысле, это подразумевает то, что пункты после слова включены, но пункты, которые не были упомянуты, также не исключены. Кроме того, ссылка на элемент с помощью неопределенного артикля "а" или "an" не исключает возможности того, что более чем один элемент присутствует, если только в контексте четко не указано, что один и только один из элементов может быть. Неопределенный артикль "а" или "an", таким образом, обычно означает "по крайней мере, один". Далее подразумевается, что, когда речь идет о "последовательности" здесь, как правило, ссылаются на реальные физические молекулы с определенной последовательностью субъединиц (например, аминокислоты).

В соответствии с документом термин "растение" включает в себя целое растение или любые части или их производные, такие как органы растений (например, сжатый или несжатый запасающий орган, луковицы, клубни, плоды, листья и т.д.), растительные клетки, протопласты растений, растительные клетки или ткани культур, из которых целые растения могут быть восстановлены, растительные каллюсы, группа побегов растительных клеток и растительные клетки, которые являются неизменными в растениях или частях растений, таких как эмбрионы, пыльца, яйцеклетки, завязи, плоды (например, собранные ткани или органы, такие, как собранные томаты или его части), цветы, листья, семена, клубни, луковицы, клонально размноженные растения, корни, корневые штаммы, стебли, верхушки корня и тому подобное. Также включена любая стадия развития, например саженцы, незрелые и зрелые и т.д.

"Сорт растения" представляет собой группу растений в пределах одного ботанического таксона низшего класса известно, что (независимо от того, условия для признания права селекционера выполнены или нет) может быть определена на основе экспрессии характеристик, которые получаются из определенного генотипа или комбинации генотипов, может отличить от любой другой группы растений степень выраженности, по крайней мере одна из этих характеристик, и может рассматриваться как единое целое, потому что это может быть умножено без 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 отличаться друг от друга чрезвычайно, 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. Самоопыление растений F1 приводит к поколению F2 и т.д. "Гибрид F1" растения (или семя F1) является поколением, полученным от скрещивания двух инбредных родительских линий. "Популяция M1" -это множество мутировавших семян/растений определенной растительной линии или сорта. "M1, M2, M3, M4, и т.д." относится к последовательным поколениям, полученным после самоопыления первых мутировавших семян/растений (M1).

Термин "аллель(и)" обозначает любую одну или несколько альтернативных форм гена в определенном локусе, все из которых относятся к аллели одного свойства или характеристике в определенном локусе. В диплоидной клетке организма, аллели данного гена находятся в определенном месте или локусе (*loci plural*) в хромосоме. Один аллель присутствует в каждой хромосоме пары гомологичных хромосом. Диплоидные растительные виды 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" (*loci plural*) означает определенное место или места, или участок на хромосоме, где

найден, например, ген или генетический маркер. Локус SIPP2C1, таким образом, участок в геноме, где найден ген SIPP2C1. Без ограничения настоящего изобретения, предполагается, что локус SlARF9 расположен в хромосоме 8 генома томата.

"Аллель дикого типа" (WT) относится здесь к версии гена, кодирующего функциональный белок (дикий тип белка). Аллель SIPP2C1 дикого типа томата сорта Moneymaker, например, представлен в SEQ ID NO: 1 (мРНК/кДНК) и SEQ ID NO: 3 (геномная ДНК, с кодирующей областью SlARF9 нуклеотида в пределах с 2005 до 5879). Аллель SlARF9 дикого типа томата сорта Heinz 1706 представлен в SEQ ID NO: 4 (геномная ДНК, с кодирующей областью SlARF9 нуклеотида в пределах с 1196 до 5869). "Мутантный аллель" относится здесь к аллелю в составе одной или нескольких мутаций в кодирующей последовательности (мРНК или кДНК, или геномной последовательности), по сравнению с диким типом аллеля. Такая мутация(и) (например, вставка, инверсия, удаление и/или замена одного или нескольких нуклеотидов) может привести к кодируемому белку, сократив в искусственных и/или в естественных условиях (снижение функции), либо не в искусственных и/или в естественных условиях (потеря функции), например, в связи с белком, будучи укороченным, или с аминокислотной последовательностью, в которой одна или более аминокислот удалены, вставлены или заменены. Такие изменения могут привести к белку, имеющему различные 3D-конформации, ставшим мишенью для различных субклеточных компарментов, имеющих измененный каталитический домен, имеющий изменение связывающей активности с нуклеиновыми кислотами или белками и т.д.

"Плоды большего размера" или "значительно увеличенные по размеру плоды", "значительно увеличенный размер плодов" или "растение, производящее плоды большего размера" в данном документе относится к значительно большему размеру плода (в среднем), по сравнению с подходящими контрольными растениями (например, растениями дикого типа), т.е. средний экваториальный диаметр и/или средний объем и/или средняя масса свежего плода значительно больше, чем у контрольного. Размер плода предпочтительно определяется в конце фазы роста (т.е. когда плод вырос до своего конечного размера), либо после нее (у выросшего плода, например, на молочной стадии).

"Большее количество клеток перикарпия" или "плоды с большим количеством клеток перикарпия" в данном документе относится к количеству клеток перикарпия и/или количеству клеточных слоев в перикарпии (включая эпидермис, экзокарпий, мезокарпий и эндокарпий), которое значительно больше (в среднем), чем в контрольных плодах. Количество клеток предпочтительно определяется в конце фазы клеточного деления (т.е. на или после около 10 дня после опыления у томата) и/или в конце фазы роста плода или после нее (у выросшего плода, например, на молочной стадии томата).

"Небольшие клетки перикарпия" относится к среднему размеру клеток перикарпия, в частности к клеткам мезокарпия, которые значительно меньше, чем у контрольных плодов (например, у диких типов плодов). Размер клетки предпочтительно определяется в конце фазы клеточного деления (т.е. на или после около 10 дня после опыления у томата) и/или в конце фазы роста плода или после нее (у выросшего плода, например, на молочной стадии).

"Растение дикого типа" относится здесь к растению, включающему аллель SlARF9 дикого вида (WT), кодирующий функциональные белки (например, в отличие от "мутантных растений", включающих мутантный аллель slarf9). Такие растения, например, являются подходящими контрольными группами в фенотипических анализах. Предпочтительно растения дикого вида и/или мутанты - "культурные растения", т.е. разнообразие, линии разведения и сорта видов, культивируемые человеком и имеющие хорошие агрономические характеристики, предпочтительно такие растения - не "дикие растения", т.е. растения, которые обычно имеют намного хуже урожай и агрономические характеристики, чем культурные растения и, например, растут естественно в диких популяциях. "Дикие растения" включают, например, экотипы, PI (интродукция растений) линии, местные сорта и дикие присоединения или дикие родственные формы видов, или так называемое видовое разнообразие или сорта, например разнообразие или сорта обычно выращены в более ранние периоды человеческой истории, но, которые не используются в современном сельском хозяйстве.

"Варианты" гена SlARF9 или белка включает как природные, так аллельные варианты, найденные в виде *S. lycopersicum*, а также ортологи, найденные в других видах растений, таких как другие виды двудольных или однодольных растений.

К диким родственным видам томата относятся *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* or *S. pennellii*.

"Средний" относится к арифметической величине.

Подробное описание изобретения

Авторы изобретения начали изучение генов, которые дифференциально выражены во множестве плодов томата, проводя анализ транскриптом (кДНК-AFLP) опыленных завязей и GA₃(гибберелловой кислоты), обработанных завязей (Vriezen и др. 2008, *New Phytologist* 177:60-76). Один ген, который был высоко выражен в неопыленных завязях и менее выражен в опыленных завязях, характеризуется дальнейшим генерированием трансгенных растений, в целях изучения роли этого гена. Ген томата был назван SlARF9 (*Solanum lycopersicum* ARF9), так как он кодирует белок 658 аминокислот, содержащий по-

следовательность аминокислоты, наиболее схожую с белком *Arabidopsis* ARF9 (52% идентичности аминокислотной последовательности и 61% идентичности последовательности кДНК, используя программу "needle", раскрытие GAP = 10 и растяжение GAP = 0,5).

Было установлено, что SlARF9 высоко выражен в семяпочке, плаценте и перикарпии опыленных завязей (см. фиг. 1). Более подробный анализ показал, что SlARF9 был также записан в другие ткани растения, такие как меристемы и корневые меристемы. Как правило, это ткани, в которых происходит многократное клеточное деление. Трансгенные растения с увеличенными уровнями SlARF9 мРНК формируют плоды, меньшие по размеру, чем плоды дикого типа. Так как плоды трансгенных линий, у которых уровни SlARF9 мРНК были сокращены, сформировали более крупные плоды, благодаря увеличению активности клеточного деления. Анализ экспрессии, а также фенотипный анализ трансгенных линий показал, что SlARF9 выступает в качестве репрессора клеточного деления в период развития плода. Примечательно, что сокращение SlARF9 иРНК путем постоянной экспрессии молекулы РНКи под контролем промотора CaMV 35S не вызвало появления других отрицательных фенотипов. Таким образом, несмотря на то, что ген SlARF9 не может считаться плод-специфическим геном, линии РНКи SlARF9 проявили только фенотип плода, указывая на то, что в других тканях растения SlARF9 может избыточно взаимодействовать с другими членами семейства белков ARF.

Сведения о том, что SlARF9 участвует в определении размера плода, могут использоваться для выращивания трансгенных и/или нетрансгенных растений с более крупными плодами либо путем сокращения количества белка SlARF9 дикого типа (или его вариантов или ортологов), либо функционирования белка дикого типа (или его вариантов или ортологов) в период роста плода, как будет указано ниже. В частности, увеличилось клеточное деление, что привело к значительному увеличению количества клеток и/или клеточных слоев в перикарпии и/или сокращению количества клеток в плоде. Таким образом, растения дают более крупные плоды с более твердыми компонентами.

Результаты исследования могут также использоваться для значительного уменьшения размера плода, по сравнению с контрольным (например, растение дикого типа) с помощью сверхэкспрессии гена SlARF9, варианта или ортолога, кодирующего функциональный белок SlARF9 (или вариант) в растении, как описано в данном документе.

Различные примеры осуществления изобретения описаны здесь ниже и в неограниченных примерах. Части, описанные здесь, применимы к трансгенным подходам, как правило, применимы и к нетрансгенным подходам и наоборот, если не указано иное.

В одном из вариантов осуществления изобретения, в котором эндогенная экспрессия SlARF9 снижается или регулируется, по крайней мере, в период роста плода, и на которых появляются более крупные плоды, представлены в данном документе. В другом варианте осуществления изобретения нетрансгенные растения, имеющие в составе один или несколько мутантных аллелей *slarf9* (либо в гомозиготной или гетерозиготной форме) и отличающиеся тем, что мутантный аллель(и) кодирует(ют) белок SlARF9, который снизил функциональность в искусственных и/или в естественных условиях по сравнению с диким типом белка, или привел к отсутствию функциональности (например, с помощью трансляционного терминирующего кодона или мутации сдвига рамки), в то время как мутация выражается в растениях (мутантных линиях или его потомстве), имеющих существенно увеличенные плоды по сравнению с растениями с отсутствием мутантного аллеля (ей) (дикие виды растений), представлены в настоящем документе. Такие нетрансгенные, растения с более крупными плодами в одном из вариантов осуществления изобретения созданы или определены с помощью TILLING подхода или Eco-TILLING, но также могут быть созданы или определены с использованием других известных методов мутагенеза в сочетании с методами разведения. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения мутантный аллель *slarf9* индуцирован и/или определен людьми, используя методы мутагенеза ("индуцированный мутант"), а в другом варианте осуществления изобретения мутантный аллель *slarf9* является "естественным мутантом", т.е. он определяется в естественных популяциях растения (таких как дикие виды томатов) и затем вводятся в элитную идиоплазму. "Индукцированные мутанты" предпочтительно генерируются в культивируемой зародышевой плазме и, таким образом, непосредственно присутствуют в агрономически ценных линиях. С другой стороны, "естественные мутанты" или "спонтанные мутанты" или "естественные варианты" или "естественные аллельные варианты/вариации" на основе естественной изменчивости (полиморфизма/мутаций), найденные в виде и, таким образом, вероятно, присутствуют в растительных материалах низших агрономического качества, не культивируются в современном сельском хозяйстве, например, в дикорастущих растениях. Позднее аллели должны быть переданы в культивируемые растения, имеющие хорошие агрономические характеристики, что и является одним из пунктов изобретения.

Применение последовательности нуклеиновых кислот и белков согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления изобретения последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотных последовательностей SlARF9 представлены в настоящем документе, а также методы выделения и определения их "вариантов", например, аллелей в пределах вида (*Solanum Lycopersicum*) или в пределах рода *Solanum* (например, дикие родственные виды томата, такие как *S. pennelli*, *S. habrochaites* и т.д.), или ортологов SlARF9 других видов растений, таких как другие виды овощных (например, виды

семейства Solanaceae, например перец или баклажан; или Cucurbitaceae, например дыня, арбуз или огурец) или полевых культур (например, кукуруза, пшеница, рис).

Дикий тип SlARF9 транскрипционного фактора белка, полученный из сорта томата Moneymaker (свежий томат) представлен в SEQ ID NO: 2. Это белок состоит из 658 аминокислот, который включает в себя несколько доменов, а именно а) ДНК-связывающий домен, расположенный на N-терминальном участке (аминокислоты 74-236 SEQ ID NO: 2), который способен связывать цис-регуляторные элементы на участке промотора генов, регулируемых ауксинов, б) средний участок ("MR", аминокислоты с 237 по 564 SEQ ID NO: 2) и с) два домена димеризации III (аминокислоты 565-602 SEQ ID NO: 2) и домен IV (аминокислоты с 609 по 651 SEQ ID NO: 2).

Белок процессингового томата сорта Heinz 1706 представлен в SEQ ID NO: 4. Он имеет идентичность последовательности 99,8% белка SEQ ID NO: 2, так как он содержит только одну отличающуюся аминокислоту. Последняя аминокислота, аминокислота 658, это гистидин (Гис) в сорте Moneymaker (SEQ ID NO: 2) и серин (Сер) в сорте Heinz 1706. Ген, кодирующий белок Heinz 1706, может, таким образом, считаться аллельным вариантом гена, найденного в свежем томате сорта Moneymaker.

"Белок SlARF9" (включая его "варианты", такие, как белки, кодируемые аллельными вариантами гена или ортологами гена) могут быть определены по их идентичности аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 2 по всей длине, т.е. белки, имеющие идентичность последовательности, по крайней мере 55, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99% или более SEQ ID NO: 2 (как определено попарным выравниванием, используя Emboss "Needle", 62 Blossum матрицу, пробел создания разрыва = 10, пробел расширения разрыва = 0,5) и имея в естественных условиях функцию, которая по существу аналогична SlARF9.

Также сюда включена потеря функции мутантов дикого типа SlARF9 белков (или их вариантов, как указано выше) или снижение функции мутантов дикого типа SlARF9 белков (или их варианты), как описано в другом месте, и растения, или части растений, в составе одного или нескольких нуклеотидных последовательностей, кодирующих такие мутанты, в которых мутантные аллели приводят к увеличению размеру плодов, по сравнению с растениями, включающими последовательность еуклеиновой кислоты, кодирующей белок SlARF9 дикого типа. Более крупными плодами являются плоды массой (в среднем) по меньшей мере 105%, предпочтительно по меньшей мере 110, 120, 130, 140, 150% или более, средней массы свежего плода плодов растений дикого типа. В некоторых случаях диаметр среднего плода составляет 105, 110, 115% или более диаметра плода растений дикого типа.

В некоторых случаях среднее количество клеток в перикарпие ткани и/или количество клеточных слоев ткани перикарпия значительно больше, чем у контрольных растений (например, у плодов растений дикого типа). Также средний размер клеток перикарпия, в частности, мезокарпия, значительно меньше, чем у контрольных растений. Предпочтительно, среднее количество клеток перикарпия (на участок, см. примеры) составляет по меньшей мере около 105, 110, 120, 130, 140, 150, 160% или более контрольных растений. Предпочтительно, число клеточных слоев составляет, по меньшей мере, 105, 110, 120% или более контрольных растений. Предпочтительно также средний размер клеток перикарпия (в частности, клеток мезокарпия) составляет по меньшей мере около 95, 92, 90, 85, 75, 72% или менее среднего размера клеток контрольных растений.

"Функция, которая, по сути, похожа на функцию SlARF9" относится в данном документе к белку с проверенной функцией определения размера плода. Растения с гиперэкспрессией SlARF9, или ее вариантом, по меньшей мере, в развитии тканей плода, производят (в среднем) значительно меньшие по размеру плоды, по сравнению с контрольными растениями (например, растения дикого типа, трансформированные с пустым вектором). И наоборот, растения со сниженными уровнями полностью функционального (дикого типа) белка SlARF9, или его варианта, по крайней мере, в развивающейся ткани плода, производят (в среднем) более крупные плоды, по сравнению с контрольными растениями (например, растениями дикого типа или растениями, трансформированными с пустым вектором). Как показано в примере, средняя масса плода сверхэкспрессированных линий SlARF9 составила менее 75% массы дикого типа, средний диаметр плода составил менее 90% дикого типа. Для сравнения, средняя масса плода подавленных линий составила более 125% массы дикого типа, а диаметр - более 105% диаметра дикого типа.

Таким образом, функция (предполагаемого) белка SlARF9 может быть проверена, используя различные известные методы, например, путем сравнения фенотипа трансформированных клеток, конститутивно выражающих белок, прошедший тестирование фенотипом SlARF9 сверхэкспрессирующих трансформированных клеток того же вида реципиента (и сорта) (предпочтительно включающих химерный кодирующий ген SlARF9, устойчиво интегрированный в геном реципиента), что позволяет провести прямое сравнение функционального влияния на фенотип трансформированных клеток.

Подобным образом, трансформированные клетки, в которых ген SlARF9 (или вариант) будет приглушен или подавлен (например, мРНК SlARF9 значительно снижается, по меньшей мере, в ткани развивающегося плода, по сравнению с диким видом или контрольной трансформированной клеткой) может быть использована для определения функции. "Значительное сокращение" мРНК транскрипта SlARF9 относится к мРНК мишени, присутствующей на уровне меньше или равном 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20% или меньше (10, 5 или 0%) уровня транскрипта, находящегося в диком виде или контрольной трансфор-

мированной клетке (например, пустой трансформированной клетке вектора). Понятно, что в любых преобразовательных экспериментах определенная степень изменения фенотипа трансформированных клеток видна, как правило, из-за позиции воздействия на геном и/или по количеству копий. Квалифицированный специалист знает, как сравнить трансформированные клетки друг с другом, например, выбрав одно число копий событий и анализируя их фенотипы. Другие методы определения или подтверждения в естественных условиях функции гена/белка включают поколение модифицированных мутантов или мутантов со сниженной функцией (например, TILLING подход) или переходные исследования экспрессии. Исследования экспрессии гена промотора-репортера могут также предоставлять информацию о пространственно-временном образце экспрессии и роли белка.

Приведенные выше методы могут быть использованы для проверки любых предполагаемых генов SlARF9, таких как аллель диких видов томата или культивируемых растений томата или томатной линии разведения или PI (интродукция растений) линии или из другого вида (например, дыни или других фруктов или видов овощей или видов сельскохозяйственных культур) действительно вариант SlARF9, который затем может быть использован для создания трансгенных и/или нетрансгенных растений, имеющих (значительно) более крупные плоды по сравнению с подходящими контрольными группами, такими, как растения дикого вида. Известно, что относительные трансгенные растения, преимущественно растения, имеющих хорошие агрономические характеристики, преобразованы и регенерированы, т.е. культивируемые растения (например, высокоурожайные сорта и селекционные линии), и что наиболее подходящие контрольные группы - пустые трансформированные клетки вектора той же линии или нескольких растений нетрансформированных линий как таковых.

Последовательности, представленные в данном документе, могут использоваться для определения, получения и/или разъединения других аллелей SlARF9 или slarf9 других растений томата, диких родственных видов томата, либо ортологи других видов. Таким образом, последовательности могут также использоваться для получения и/или определения растений, имеющих один или несколько мутантных аллелей slarf9 в их геноме, где мутация ведет к значительному увеличению размеров плода. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения представлено применение гена SlARF9 для определения и/или получения растений, имеющих один или несколько мутантных аллелей slarf9, способных производить более крупные плоды.

Предпочтительно, растения, согласно настоящему изобретению, имеют один или несколько мутантных аллелей slarf9 (или вариантов) и производят более крупные плоды, но не производят меньше плодов, чем растения дикого типа. Таким образом, количество плодов на одном растении, предпочтительно, не уменьшилось. В одном варианте осуществления изобретения растения согласно настоящему изобретению производят плоды в конце периода производства плодов, которые имеют такой же размер, как плоды дикого типа в середине данного периода. Размер плода дикого типа томата в конце периода роста плода меньше по причине условий окружающей среды. Подобный эффект в конце сезона компенсируется растениями, согласно настоящему изобретению.

Другие предполагаемые гены/белки SlARF9 могут быть определены в кремнии, 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, таких как последовательность инструментов поиска сходства (BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLAST, FASTA и т.д.). Предполагаемые аминокислотные последовательности или последовательности нуклеиновых кислот, включающие или кодирующие белок SlARF9 (как определено выше) выбраны, клонированные или синтезированные заново и проверены на функциональность в естественных условиях, например, путем сверхэкспрессии или сайленсинга в растении-реципиенте. Следует отметить, что назначение SlARF9 также используется в данном документе для белков, которые происходят из видов, кроме *Solanum Lycopersicum*, т.е. префикс Sl здесь не ограничивают белок какого-то конкретного вида.

В одном из вариантов осуществления изобретения предоставляются сниженная функция или потеря функций мутантных белков SlARF9 (включая варианты или ортологи, как определено в данном документе), а также растения и их части в составе одного или нескольких аллелей slarf9 в их геноме, которые кодируют сниженную функцию или потерю функции мутантов, где сниженная функция или потеря функции позволяет значительно увеличить размер плода, в случае их присутствия в геноме растения.

Любой тип мутации может привести к снижению функции или потере функции кодируемого белка SlARF9, например, вставки, удаления или замены одного или нескольких нуклеотидов в кДНК (SEQ ID NO: 1, или варианты), либо в соответствующей геномной последовательности SlARF9 (нуклеотиды 2005-5879 SEQ ID NO: 3, нуклеотиды 1198-5869 SEQ ID NO: 4 или ее варианты), в частности в любой из 14 последовательностей экзона (см. SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4) и/или пределы интрона/экзона белков SlARF9 (или их вариантов, включая ортологи). В предпочтительном варианте осуществления изобретения представлена последовательность нуклеиновой кислоты slarf9, способная увеличивать размер плода, при этом последовательность нуклеиновой кислоты кодирует сокращение или потерю функции белка SlARF9 по причине одной или нескольких мутаций на участке, кодирующем ДНК-связывающий домен (аминокислота 74-236 SEQ ID NO: 2, кодируемые экзонами 3-8), MR (аминокислота 237-564 SEQ ID NO:

2, кодируемые экзонами 8-12, а также в пределах MR аминокислот 256-332 наиболее предпочтительны, кодируемые экзонами 8-10), домен димеризации III (аминокислоты 565-602 SEQ ID NO: 2, кодируемые экзонами 12 и 13) и/или домен димеризации IV (аминокислоты 609-651 SEQ ID NO: 2, кодируемые экзонами 13 и 14).

Влияние мутации на функцию белка (сокращение или потеря функции) можно установить с помощью анализа SIFT (Pauline C. Ng and Henikoff 2003, *Nucleic Acid. Research*. Том. 31, стр. 3812-3814), либо определить путем оценки влияния на размер плода (определение фенотипа).

В естественных условиях сокращения или потери функции подобные белки могут быть проверены, как описано выше, путем определения влияния данного мутантного аллеля на увеличение размера плода. Растения, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую такие мутантные белки со сниженной функцией или с потерей функции и более крупными плодами, могут быть, например, созданы с помощью TILLING подхода или идентифицированы с помощью EcoTILLING подхода, как описано ниже.

В одном из случаев реализации изобретения (кДНК или геномные) последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих такие мутантные белки, состоят из одной или нескольких смысловых и/или бессмысловых мутаций, например переходов (замена пурина с другим пурином (A ↔ G) или пиримидина с другой пиримидином (C ↔ T)) или трансверсией (замена пурина с пиримидином, или наоборот (C/T ↔ A/G)). В одном варианте осуществления изобретения бессмысловая и/или неправильная смысловая мутация(и) нуклеотидной последовательности, кодирующей любой из экзонов SlARF9, более предпочтительно на участках, кодирующих указанные выше домены белка (ДНК-связывающий домен, MR, домен димеризации III и/или домен димеризации IV) или схожий домен варианта белка SlARF9, т.е. домен, содержащий по меньшей мере не менее 80, 90, 95, 98, 99% аминокислотной идентичности данного домена SEQ ID NO: 2).

В одном варианте осуществления изобретения представлена нуклеотидная последовательность slarf9, содержащая одну или несколько бессмысловых мутаций и/или неправильных мутаций в экзоне 2-, экзоне 3-, экзоне 4-, экзоне 5-, экзоне 6- и/или экзоне 7-, кодирующей последовательность, а также растение, содержащее мутантный аллель и имеющее более крупные плоды, чем растения, содержащие аллели только дикого типа (кодирующие функциональный белок SlARF9).

В определенном варианте осуществления изобретения представлены растения и части растения (плоды, семена и т.д.), содержащие мутантную потерю функции или сниженную функцию аллеля slarf9.

В одном варианте осуществления изобретения потеря функции или сниженная функция белка SlARF9 - это укороченный белок, т.е. фрагмент одного из белков SlARF9, определенных ранее (включая его варианты). В общем EMS (этилметансульфонат) индуцирует замены гуанин/цитозин аденином/тиминном. В случае глутамин (Gln или Q, кодируемый нуклеотидами CAA или CAG) или аргинин (Arg или R, кодируемый нуклеотидами CGA) кодон, замена цитозина в тимин может привести к введению в стоп-кодон в рамке считывания (например, CAA/CAG/CGA к TAA/TAG/TGA), в результате получения укороченный белок.

Также представляемые последовательности нуклеиновых кислот (геномная ДНК, кДНК, РНК), кодирующие белки SlARF9, такие как, например, SlARF9, представленный в SEQ ID NO: 2 или их вариантах, как указано выше (в том числе химерные или гибридные белки или мутировавшие белки или укороченные белки), или любым белке SlARF9 из других видов. В результате вырождения генетический код различных последовательностей нуклеиновых кислот может кодировать ту же аминокислотную последовательность. Любая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок SlARF9 (как определено выше, включая варианты) в данном документе называется SlARF9. Представленные последовательности нуклеиновых кислот включают условные, искусственные или синтетические последовательности нуклеиновых кислот. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие SlARF9 представлены в SEQ ID NO: 1 (кДНК) и 3 (геномная последовательность томата сорта Moneymaker, в том числе нуклеотиды 2005-5879 представляют собой участок, кодирующий белок, с нитронами), а также в SEQ ID NO: 4 (геномная последовательность томата сорта Heinz 1706, в том числе нуклеотиды 1196-5869 представляют собой участок, кодирующий белок, с нитронами).

Известно, что, когда последовательности изображаются в качестве последовательности ДНК, а РНК называют, фактическая последовательность оснований молекулы РНК совпадает с той разницей, что тимин (Т) заменяет урацил (U).

Также представлены последовательности нуклеиновых кислот (геномная ДНК, кДНК, РНК), кодирующие мутировавшие белки SlARF9, т.е. белки со сниженной функцией или потерей функции белков SlARF9, как описано выше, а также растения и части растений, содержащие подобные мутантные последовательности. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, состоящая из одной или нескольких смысловых и/или бессмысловых мутаций в диком типе кодирующей последовательности SlARF9, передающей кодируемый белок, нефункциональный или с пониженной функцией в естественных условиях. Кроме того, представлены последовательности с другими мутациями, например сплайс-сайт мутанты, т.е. мутации в геномной последовательности slarf9, ведущей к аномальному сращиванию пре-

мРНК и/или сдвига рамки мутации, и/или вставке (например, вставке транспозона) и/или удалению одной или нескольких нуклеиновых кислот.

В данном документе представлены две геномные последовательности SlARF9 дикого типа, одна свежего томата сорта Moneymaker (SEQ ID NO: 3) и другие обработанного сорта Heinz 1706 (SEQ ID NO: 4). Как было указано, кодирующий участок идентичен, отличается только последний кодон, кодирующий гистидин в SEQ ID NO: 3 и сирийн в SEQ ID NO: 4. Последовательности, кодирующие ДНК (без интронов), имеют идентичность последовательности 99,9%. Геномная кодирующая ДНК, включая интроны (нуклеотиды 2005-5879 SEQ ID NO: 3 и нуклеотиды 1196-5869 SEQ ID NO: 4) имеет идентичность последовательности 99,8%, так как в последовательностях интронов есть нуклеотидные различия. Промоторы генов (нуклеотиды 1-2004 SEQ ID NO: 3 и 1-1995 SEQ ID NO: 4) также имеют большую идентичность последовательности 98,7%.

Также включены варианты и фрагменты последовательностей нуклеиновой кислоты SlARF9, такие как последовательности нуклеиновых кислот с гибридизацией SlARF9 последовательностей нуклеиновых кислот, например, в SEQ ID NO: 1 или 3 (нуклеотиды 2005-5879), в жестких условиях гибридизации, как определено. Варианты последовательностей нуклеиновых кислот SlARF9 также включают последовательности нуклеиновых кислот, которые имеют идентичность последовательности SEQ ID NO: 1 или до SEQ ID NO: 3 (нуклеотиды 2005-5879) или до SEQ ID NO: 4 (нуклеотиды 1996-5869), по меньшей мере 60% или более, предпочтительно по меньшей мере 65, 70, 80, 85, 90, 95, 98, 99, 99% или более (как это определены Emboss "needle", используя параметры по умолчанию, т.е. пробел создания разрыва = 10, пробел расширения разрыва = 0,5, измеряемая матрица nwsgapdna). Как было описано, варианты также включают мутантные варианты slarf9. Понятно, что многие методы могут быть использованы для выявления, обобщения и выделения вариантов или фрагментов SlARF9 последовательностей нуклеиновых кислот, такие как гибридизация нуклеиновых кислот, PCR-технологии, анализ *in silico* и синтез нуклеиновых кислот и тому подобное. Варианты SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 (нуклеотиды 2005-5879) или SEQ ID NO: 4 (нуклеотиды 1996-5869) могут кодировать либо дикий тип функциональных белков SlARF9 (например, аллелей другого видового разнообразия томата или селекционных линий или диких присоединений или ортологов из других видов, чем томаты), либо они могут кодировать мутантные аллели со сниженной функцией или с потерей функции любого из них, как, например, подготовленных или определенных методами, такими как TILLING подход или EcoTILLING подход или другими способами.

Фрагменты включают части любых из вышеперечисленных последовательностей нуклеиновых кислот SlARF9 (или вариантов), которые могут, например, использоваться в качестве праймеров, или образцов, или конструкций подавления активности гена или для определения мутантных аллелей slarf9 (например, праймеров, используемых в TILLING подходе, например, праймеров SEQ ID NO: 15-22). Части могут быть смежными участками по меньшей мере около 10, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 50, 60, 100, 200, 300, 420, 450, 500, 600, 700, 800, 900 или более нуклеотидов в длину, либо кодирующей нити (смысловой нити) или комплементарной нити (антисмысловой нити). Также включены смысловые - антисмысловые конструкции таких фрагментов, способных образовывать двухспиральную РНК (либо со спейсерной областью между смысловым и антисмысловым фрагментом) при транскрибировании в клетку растения (см. сайленсинг гена). Таким образом, фрагменты последовательностей нуклеиновой кислоты SlARF9 включены, в результате чего фрагмент, по меньшей мере, около 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 100, 150, 200, 300, 400, 420, 450, 500, 600, 700, 800, 900 нуклеотидов в длину составляет не менее 50, 60, 70, 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80, 90, 95, 98, 99% или более (100%) идентичности последовательности нуклеиновых кислот в другом фрагменте SlARF9 последовательности нуклеиновых кислот примерно такой же длины (как определено попарным выравниванием, используя Emboss "needle", параметры по умолчанию, т.е. пробел создания разрыва = 10, пробел расширения разрыва = 0,5, измеряемая матрица nwsgapdna).

Пары праймеров, которые могут быть использованы для PCR-амплификации транскриптов SlARF9 или slarf9 (мРНК или соответствующей кДНК или геномной ДНК) из растительных образцов ДНК тканей. Пары праймеров могут использоваться для определения и/или определения количества экспрессии SlARF9 или slarf9 (мРНК уровней) в ткани растения, например, в тканях плодов томата, например, для определения значительного сокращения эндрогенных уровней SlARF9 мРНК или наличия в геноме мутантного аллеля slarf9. Точно так же могут быть разработаны определенные специфические или вырженные праймеры на основе SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 и используемые для усиления/определения вариантов аллелей SlARF9 (например, мутантные аллели slarf9) из/в других линиях томата, родственных видов дикого типа томата, либо других видов растения.

После того как ткань растения, содержащего конкретный мутантный аллель slarf9, был сформирован и/или определен (например, путем Тиллинга или EcoTILLING подходов), а также праймеров или образцов, специфичных для мутантного аллеля, может быть разработан, и также может быть разработан анализ, который обнаруживает присутствие и/или отсутствие мутантного аллеля в растении или части растения (с использованием аллеля конкретных анализов обнаружения). Молекулярные маркерные анализы для обнаружения и/или передачи (например, с помощью MAS, вспомогательной маркерной селекции) мутантного аллеля, могут получить развитие. Например, может быть разработан анализ SNP обна-

ружения или CAPS маркер, который определяет наличие мутанта *slarf9* нуклеиновой кислоты в ДНК растений и/или который может быть использован для передачи аллеля в другие растения.

В одном варианте осуществления изобретения представлен мутант последовательностей нуклеиновой кислоты *slarf9*, согласно которому последовательность нуклеиновой кислоты *slarf9* состоит из одной или нескольких мутаций, приводящих либо к потере функции или снижению функции мутанта белка SIARF9. Этот аспект изобретения будет описан более подробно в данном документе далее.

Растения также могут быть определены или получены (например, с помощью гомологичной рекомбинации или вставки, удаления или замены одного или нескольких нуклеотидов и т.д.), которые имеют одну или несколько мутаций на регуляторном участке(ах) SIARF9, например, промоторе, в котором экспрессия генов SIARF9, т.е. уровни мРНК (SEQ ID NO: 1 или варианты) значительно сокращаются в растении по сравнению с диким типом и растение имеет более крупные плоды, чем растение дикого типа, содержащее регуляторный участок дикого типа (например, промотор).

Участок промотора SIARF9 описан в нуклеотидах 1-2004 SEQ ID NO: 3 и нуклеотидах 1-1995 в SEQ ID NO: 4. Два данные последовательности промотора имеют идентичность последовательности 98,7%. Промотор SIARF9 томата дикого типа проявляет активность ранних стадиях развития плода (в перикарпии, семяпочках, плаценте опыленных завязей), в пазушных меристемах, кончиках корня, зародышевых боковых корнях. SEQ ID NO: 3 и 4 включают два ауксин-отвечающих элемента (AuxRE) на участке промотора, на позициях 612-617 (TGTCNC) и 1224-1229 (TGTCTN) SEQ ID NO: 3 и на позиции 612-617 (TGTCNC) и 1229-1234 ((TGTCTN) SEQ ID NO: 4. Кроме того, SEQ ID NO: 3 включает четыре элемента NTBBF1ARROLB (ACTTTA, в позициях 888-893, 1541-1546, 1824-1829 и 1831-1836), в то время как SEQ ID NO: 4 включает всего три таких элемента (в позициях 888-839, 1815-1820, 1824-1829 и 1822-1827). Данные *cis*-действующие регулирующие элементы могут приводить к регуляции транскрипции другими ARF и/или белками, подобными Dof. Мутации данных элементов могут снижать производство транскрипта SIARF9, ведущего к росту более крупных плодов на растениях. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения представлены растения, части растений или ткани, имеющие одну или несколько мутаций на эндогенном (дикого типа) участке промотора SIARF9, в частности в одном или нескольких AuxRE и/или элементах NTBBF1ARROLB, в которых данные растения имеют более крупные плоды. Подобные растения можно получить, например, с помощью TILLING подход. В частности, в данном документе указаны мутации (транзиции и трансверсии) в G в AuxRE и/или C в элементе(ах) NTBBF1ARROLB. Растения, включающие мутации в промоторе SIARF9, в которых активность промотора значительно снижена, по меньшей мере, во время раннего развития плода, в которых растение производит более крупные плоды можно определить с помощью, например, TILLING подхода или другими известными методами.

"Промотор SIARF9" согласно настоящему изобретению - это промотор, включающий по меньшей мере 90, 95, 98, 99 или 100% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты к нуклеотидам 1-2004 SEQ ID NO: 3 или нуклеотидам 1-1995 SEQ ID NO: 4 (используя программу попарного выравнивания Needle с настройками по умолчанию). Согласно настоящему изобретению в естественных условиях такой промотор ведет экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты SIARF9 или вариант (например, дикий тип SIARF9 или мутантный ген *slarf9*). В данном документе указаны мутантные промоторы SIARF9 (и содержащие их растения).

В данном документе также указаны химерные гены и векторы, содержащие промотор SIARF9, и трансгенные растения, содержащие промотор SIARF9, функционально связанный с белком, кодирующим нуклеиновую кислоту или ген сайленсинга конструкта (смысловая и/или антисмысловая последовательность). Промотор может использоваться для экспрессии химерных генов в развивающихся плодах. Активные фрагменты по меньшей мере 2000, 1700, 1600, 1500, 1200, 100, 800, 600, 500, 400, 300 нуклеотидов (полученных, например, путем удаления промотора на 5'-конце) промотора SIARF9 могут также подходить для предпочтительной экспрессии плода.

Последовательность нуклеиновой кислоты SIARF9, описанной выше, или ее фрагменты, в частности последовательности ДНК, кодирующие белки SIARF9 данного изобретения (или их варианты) могут быть вставлены в векторы экспрессии (в подавляющих подходах) или в векторы сайленсинга гена для получения растений с более крупными плодами.

В одном из вариантов осуществления изобретения экспрессия гена SIARF9 подавлена в клетке-реципиенте, растении или конкретной ткани(ях), например, подходами RNAi, как это описано далее.

В другом варианте осуществления изобретения представлены растения, содержащие один или несколько мутантных аллелей *slarf9*, в которых мутация(и) дает более крупные плоды на растениях, по сравнению с растениями, у которых отсутствует мутантный аллель(и). Мутантные аллели предпочтительно полученные путем мутагенеза растений или семян, а также выявлением тех растений или семян, которые содержат одну или несколько мутаций в мишени аллеля(ий) SIARF9 и в которых мутация приводит к отмене транскрипции мРНК и/или трансляции (чтобы производство белка SIARF9 сократилось или прекратилось), или в трансляции мутантного аллеля *slarf9*, транслированные в белок SIARF9 со сниженной или потерей функции. Снижении или отмена функционального белка SIARF9 дикого типа, по меньшей мере, в ткани плода (предпочтительно, по меньшей мере, на раннем этапе развития плода), дает

возможность получить значительно более крупные плоды на растении или семенах. В одном варианте осуществления изобретения растение имеет два эндогенных мутантных аллеля *slarf9*, т.е. является гомозиготным для *slarf9*. Такое растение можно получить с помощью самовоспроизводства растения с одним мутантным аллелем *slarf9*. Также представлены плоды и семена с по меньшей мере одним или двумя мутантными аллелями *slarf9* в их геноме, у которых плоды значительно крупнее по сравнению с растениями, имеющими аллели дикого типа *SIARF9* (кодирующими функциональный белок *SIARF9*).

В другом варианте осуществления изобретения предоставлены праймеры PCR и/или образцы и комплекты для обнаружения ДНК *S1PP2C1* последовательности *SIARF9* или *slarf9*. Вырожденные или пары праймеров PCR для амплификации ДНК *SIARF9* или *slarf9* из образцов могут быть синтезированы на основе SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 или 4, как известно, в уровне техники (см. Dieffenbach и Dveksler (1995) праймер PCR: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, and McPherson et al. (2000) PCR-Basics: From Background to Bench, First Edition, Springer Verlag, Germany). Кроме того, фрагменты ДНК SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 (или их варианты) могут быть использованы в качестве образцов гибридизации. Комплект обнаружения *SIARF9* или *slarf9* может состоять либо из *SIARF9* и/или специфических праймеров *slarf9* и/или специфических образцов *slarf9*, а также связанного протокола при использовании праймеров и образцов для обнаружения *SIARF9* и/или *slarf9* ДНК в исследуемой пробе. Такой комплект обнаружения может, например, быть использован для определения того, было ли растение преобразовано с помощью гена *SIARF9* (или его части) изобретения или включает в себя растение одну или несколько мутантных аллелей *slarf9*. В результате вырождения генетического кода некоторые аминокислоты кодонов могут быть заменены другими без изменения аминокислотной последовательности белка.

В другом варианте осуществления изобретения представлены антитела, которые специфически связываются с белком *SIARF9* или мутантным белком *SIARF9*, согласно настоящему изобретению. В частности моноклональные или поликлональные антитела, которые связываются с *SIARF9* или с фрагментами или их вариантами (например, мутантные белки), описаны в данном документе. Антитела могут быть получены с помощью белка *SIARF9* согласно изобретению в качестве антигена в животных с использованием методов, известных в уровне техники, как, например, описанные в Harlow and Lane "Using Antibodies: A laboratory manual" (New York: Cold Spring Harbor Press 1998) и в Liddell and Cryer "A Practical Guide to Monoclonal Antibodies" (Wiley and Sons, 1991). Антитела могут быть впоследствии использованы для выделения, идентификации, определения свойств или очищения белка *SIARF9*, с которым он связывается, например, для обнаружения белка *SIARF9* в исследуемой пробе, что позволяет формировать иммунокомплексы и обнаруживать присутствия иммунокомплексов, например, путем ELISA (иммуноферментного твердофазного анализа) или анализа иммуноблота. Кроме того, предоставлены иммунологические комплекты, полезные для определения белков *SIARF9*, белковых фрагментов или эпитопов в исследуемой пробе. Исследуемыми пробами могут быть клетки, клеточные супернатанты, суспензии клеток, тканей и т.д. Такой комплект включает в себя, по меньшей мере, антитело, которое специфически связывается с белком *SIARF9* и один или несколько реагентов иммунодетекции. Антитела могут также быть использованы для выделения/выявления других белков *SIARF9*, например, с помощью ELISA или Western blotting.

Понятно, что многие методы могут быть использованы для выявления, обобщения и выделения вариантов или фрагментов последовательностей нуклеиновых кислот *SIARF9* или *slarf9*, такие как гибридизация нуклеиновых кислот, PCR-технологии, анализ *in silico* и синтез нуклеиновых кислот и тому подобное. Таким образом, последовательность кодирования белка *SIARF9* нуклеиновой кислоты может быть последовательностью, которая химически синтезирована или которая клонирована из любых видов растений.

Трансгенные растения с более крупными плодами.

В данном документе представлены трансгенные растения, семена и части растений, в которых приглушен *SIARF9*, предпочтительно, по меньшей мере, в ткани листа, которые имеют более крупные плоды по сравнению с диким типом (нетрансгенных) контрольных растений или других контрольных растений (например, пустых трансформированных клеток вектора) в результате сайленсинга гена *SIARF9*.

В одном варианте осуществления изобретения гомологичная или гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты используется для приглушения эндогенного гена(ов) *SIARF9* реципиента, который должен быть преобразован. Например, ген томата *SIARF9* (или вариант или его фрагмент) может быть использован, чтобы приглушить экспрессию гена *SIARF9* в трансгенных растениях томата, баклажана или арбуза. Кроме того, может быть использована гомологичная последовательность нуклеиновой кислоты *SIARF9*. Например, последовательность происходящих из конкретных видов растений (например, из томатов) будет восстановлена в указанных виды (томата). Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения ДНК *SIARF9* соответствует, или является модификацией/вариантом, эндогенной ДНК *SIARF9* видов, которые используются в качестве рецептивных видов в трансформации. Таким образом, к ДНК *SIARF9* томата или геномная ДНК (или вариант или ее фрагмент) предпочтительно используется для трансформации растений томата. Кроме того (для регуляторного одобрения и общественного принятия причин), гомологичная или гетерологичная последовательности

нуклеиновых кислот могут быть функционально связаны с транскрипцией регуляторной последовательности, особенно промотора, который также происходит от вида растения или даже из того же растения, которое будет трансформировано. Например, может использоваться промотор SIARF9, как описано выше.

Для создания растений, содержащих химерный ген, который в результате приводит к приглушению экспрессии эндогенного гена SIARF9 или семейства генов, могут быть использованы методы, известные в уровне техники.

"Сайленсинг генов" относится к понижающей регуляции или полному подавлению экспрессии генов одного или нескольких генов-мишеней, например генов SIARF9 в клетки-реципиенте или ткани. Понятно, что в любых преобразовательных экспериментах определенная степень изменения фенотипа трансформированных клеток видна, как правило, из-за позиции воздействия на геном и/или по количеству копий. Как правило, "слабый" и "сильный" сайленсинг генов растений отличается здесь (все из которых являются случаями реализации изобретения), в котором "слабый" сайленсинг гена (РНК-интерференция) относится к растениям или части растений, в которых эндогенная экспрессия гена-мишени снижается примерно на 15, 20 или 30% по сравнению с контрольной тканью и "сильный" сайленсинг генов (РНК-интерференция) относится к растениям или части растений, в которых ген эндогенной экспрессии гена-мишени снижен не менее чем на 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с контрольной тканью (например, диким видом). Сайленсинг может быть определен количественно, например, подсчитывая уровень транскрипта гена-мишени (например, с помощью количественного RT-PCR) и/или определяя и выборочно подсчитывая энзимную активность белка-мишени и/или оценивая и выборочно подсчитывая полученный фенотип (более крупные плоды).

Не ограничивая масштабы изобретения, растения, имеющие оптимальный уровень сайленсинга, могут быть выбраны так, чтобы в результате растения имели значительно более крупные плоды в климатических условиях, к которым они подвергаются в период развития плода, имея минимальные отрицательные побочные эффекты, такие как снижение урожайности и т.д. по сравнению с контрольной группой. Предпочтительно, в урожайность значительно возросла в приглушенных растениях SIARF9.

Применение ингибиторных РНК для сокращения или упразднения экспрессии генов хорошо известно в уровне техники и является предметом нескольких рецензий (например, Baulcombe 1996, *Plant Cell* 8(2):179-188; Depicker and Van Montagu, 1997, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9(3): 373-82). Есть целый ряд доступных технологий для достижения сайленсинга генов в растениях, таких как химерные гены, которые производят антисмысловую РНК во всех или части гена-мишени (см., например, EP 0140308 B1, EP 0240208 B1 и EP 0223399 B1), которые производят или чувствительную РНК гена-мишени (также известную как "совместное подавление"), см. EP 0465572 B1.

Наиболее успешным подходом до сих пор является производство как смысловых и антисмысловых РНК гена-мишени ("инвертированные повторы"), который является двухцепочной РНК (дсРНК) или стволым циклом структуры (петля РНК, *vmRNA*) в клетке и приглушает ген-мишень(и) при транскрипции из вышестоящего промотора. Методы и векторы дсРНК и *vmРНК* производства и сайленсинга генов были описаны в EP 1068311, EP 983370 A1, EP 1042462 A1, EP 1071762 A1 и EP 1080208 A1.

Химерный ген для трансформации растений может, таким образом, включать транскрипцию регуляторного участка, который активен в клетках растений, функционально связанных со смысловым и/или антисмысловым фрагментом ДНК (или полной последовательностью нуклеиновой кислоты), или комплиментарного или по существу аналогичного гена-мишени SIARF9 или семьи генов.

Обычно короткие (смысловые и антисмысловые) фрагменты секвенирования последовательности гена-мишени, такие как 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотиды, кодирующие и/или не кодирующие последовательности гена-мишени достаточны. Более длинные последовательности также могут быть использованы, например по крайней мере около 50, 100, 200, 250, 300, 400, 420, 450, 500, 1000 или более нуклеотидов. Даже с ДНК, соответствующими или комплиментарными, полный транскрипт РНК или мРНК может быть использован, чтобы создать смысловые и/или антисмысловые конструкции. Желательно, чтобы смысловые и антисмысловые фрагменты/последовательностей, разделены спейсером последовательности, такие как интрон, который образует петлю (или шпильку) на формирование дсРНК.

В принципе, любой ген SIARF9 или семейство гена может стать мишенью. Например, одна или несколько определенных аллелей SIARF9 может быть приглушена выбором участка нуклеиновой кислоты их первичных или мРНК транскриптов, специфичных для этих аллелей (см. *Vuzova et al. Plant* 2004 218: 379-387 для специфического сайленсинга аллелей органичным определенным образом). Кроме того, вся семья гена может стать мишенью для сайленсинга, выбрав один или более закрепленных участков для создания конструкта сайленсинга. Как упоминалось выше, участок ДНК, используемый в смысловой и/или антисмысловой ориентации, не должны быть частью кодирующего участка, но также может соответствовать или дополнять части первичного транскрипта (включая 5' и 3' нетранслируемую последовательности и интроны; первичный транскрипт SIARF9 томата сорта *Moneymaker*, как указано в SEQ ID NO: 3, из нуклеотидов 1551-6323, кодирующий участок, присутствующий в нуклеотиде 2005-5879) или в частях транскрипта мРНК (где любые интроны были удалены и полиА окончание было добавлено). Известно, что в последовательности ДНК, которая соответствует последовательности РНК U, заменяется на

Т. Также отмечено, что в химерном гене, который преобразовывает дсРНК или мРНК мишени, способном к сайленсингу экспрессии генов SIARF9 на транскрипцию в клетке-реципиенте, смысловые и антисмысловые участки не должны быть одинаковой длины и один участок может быть больше, чем другие.

Таким образом, например, SEQ ID NO: 1 или их варианты, как описано выше, или фрагменты любого из них, или геномная последовательность или первичная последовательность транскрипта SEQ ID NO: 3 или 4, может быть использована для создания сайленсинга гена SIARF9 и вектора и трансгенного растения, в которых один или несколько генов SIARF9 приглушены во всех или некоторых тканях или органах (предпочтительно, по меньшей мере, в развивающихся плодах), или по индукции (см., например, Wielopolska et al. *Plant Biotechnol J.* 2005 6:583-90). Пример вектора сайленсинга гена приведен в примерах, при этом инвертированный повтор фрагмента 420 bp среднего участка (MR) кодирующей части SEQ ID NO: 1 использовалась для приглушения эндогенного SIARF9 в томате с помощью конститутивной экспрессии под контролем промотора CaMV 35S.

Удобный способ создания шпильки конструкции заключается в использовании общих векторов, таких как pHANNIBAL, pHELLSGATE, pSTARGATE векторы на основе технологии the Gateway® (см. Wesley et al. 2004, *Methods Mol. Biol.* 265:117-30; Wesley et al. 2003, *Methods Mol. Biol.* 236:273-86 и Hellwell & Waterhouse 2003, *Methods* 30(4):289-95), указаны здесь в качестве ссылки. См. также <http://www.pi.csiro.au/rnai/> других генных сайленсингов векторов, таких, как индуцируемый сайленсинг векторов и векторы для сайленсинга из нескольких генов-мишеней и программы MatchPoint, которая может быть использована, чтобы найти лучшую последовательность, чтобы использовать для сайленсинга гена-мишени.

При выборе консервативных последовательностей нуклеиновых кислот все члены семейства генов SIARF9 в растении-реципиенте могут быть приглушены. Сайленсинг всех представителей семейства растения-реципиента является конкретным случаем реализации.

В одном варианте осуществления изобретения промотор, который функционально связан со смысловой и/или антисмысловой последовательностью нуклеиновой кислотой (чтобы создать химерный сайленсинг/РНК-интерференции генов), выбирается из конститутивного промотора, индуцируемого промотора (например, химически индуцируемого и т.д.), гормона индуцируемого промотора (например, ауксин индуцируемого) конкретного промотора плода или промотора, регулируемого развитием (например, активного в период развития плода). Кроме того, промотор гена SIARF9 сам по себе может быть использован для подходов сайленсинга, т.е. как указано выше, промотор SIARF9. Дополнительно 3'UTR может быть функционально связан с 3' терминальным химерным геном, так что функционально взаимосвязанные элементы ДНК, включают промотор - SIARF9 RNAи ген - 3'UTR.

Предпочтительные конститутивные промоторы включают в себя сильные конститутивные промоторы 35S или усиленные промоторы 35S ("35S промоторы") мозаичного вируса цветной капусты (CaMV) изолированных CM 1841 (Gardner et al., 1981, *Nucleic Acids Research* 9, 2871-2887), CabbB-S (Franck et al., 1980, *Cell* 21, 285-294) и CabbB-CO (Hull and Howell, 1987, *Virology* 86,482-493), 35S промотор, описанный Odell et al. (1985, *Nature* 313, 810-812) или в US 5164316, промоторах семейства убиквитина (например, убиквитин промотор Christensen et al., 1992, *Plant Mol. Biol.* 18,675-689, EP 0342926, см. также Cornejo et al. 1993, *Plant Mol. Biol.* 23, 567-581), *gos2* промотор (de Pater et al., 1992 *Plant J.* 2, 834-844), *emu* промотор (Last et al., 1990, *Theor. Appl. Genet.* 81,581-588), арабидопсис промоторы актина, таких как промотор, описанный An et al. (1996, *Plant J.* 10, 107), рисовые промоторы актина, такие как промотор, описанный Zhang et al. (1991, *The Plant Cell* 3, 1155-1165) и промотор, описанный в US 5641876 или рисовый промотор 2 актина, как описано в WO 070067, промоторы мозаичного венозного вируса маниоки (WO 97/48819, Verdagner et al. 1998, *Plant Mol. Biol.* 37, 1055-1067), pPLEX виды промоторов из подземного останавливающего развитие вируса клевера (WO 96/06932, в частности промотор S7), промотор алкогольдегидрогеназы, например, pAdh1S (регистрационные номера GenBank X04049, X00581), а TR1 "промотор и промотор TR2" ("TR1 промотор" и "TR2 промотор" соответственно), которые управляют экспрессией 1 и 2 гена соответственно, Т-ДНК (Velten et al., 1984, *EMBO J.* 3, 2723-2730), промотор мозаичного вируса норичника, описанного в US 6051753 и EP 426641, промоторы генов гистонов, таких как Ph4a748 промотор из арабидопсиса (PMB 8: 179-191) или другие.

В противном случае, может быть использован промотор, который не является конститутивным, а специфичным для одной или нескольких тканей и органов растений (ткань предпочтительная/ткань специфичная, в том числе промоторы, регулируемые развитием). Например, промотор, активный в ткани плода и/или в период развития плода. Например, может использоваться промотор SIARF9 или его активный фрагмент. В противном случае, может использоваться промотор TPTP-F1, который представляет собой завязь и специфический молодой плод. 200, supra) или другие.

Квалифицированный специалист может легко проверить различные промоторы на их специфику и целесообразность в методике согласно данному изобретению. Кроме того, специфика промотора может быть изменена путем удаления, добавления или замены части последовательности промотора. Такое изменение промоторов может быть функционально связано с генами-репортерами для проверки их пространственно-временной активности в трансгенных растениях.

Другая альтернатива - использование промотора, экспрессия которого индуцируема. Примеры ин-

дуцируемых промоторов - химически индуцируемые промоторы, такие как дексаметазон, как описано Aoyama и Chua (1997, *Plant Journal* 11: 605-612) и в US6063985 или тетрациклин (TOPFREE или TOP 10 промотор, Gatz, 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 89-108 и Love et al. 2000, *Plant J.* 21:579-88).

По желанию, промотор-SIARF9 гена RNAи может дополнительно содержать 3'-терминальную регуляцию транскрипции сигналов ("3' терминальная или 3' UTR") (т.е. формирование транскрипта и сигналы полиаденилирования). Сигналы полиаденилирования и транскрипта образования сигналов включают нопалин ген синтазы ("3' nos") (Depicker et al., 1982 *J. Molec. Appl. Genetics* 1, 561-573.), Октопин ген синтазы ("3'ocs") (Gielen et al., 1984, *EMBO J.* 3, 835-845) и Т-ДНК ген 7 ("3' ген 7") (Velten and Schell, 1985, *Nucleic Acids Research* 13, 6981-6998), которые действуют как 3'-нетранслируемые последовательности ДНК в трансформированных клетках растений и т.д. Кроме того, может использоваться 3'-конец гена SIARF9, т.е. последовательность, включающая или состоящая из нуклеотидов 5880-6323 SEQ ID NO: 3.

Химерный ген сайленсинга SIARF9 (т.е. промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая при транскрипции в растительной клетке способна к сайленсингу эндогенной экспрессии генов SIARF9) может быть включен обычным образом в ядерном геноме одной клетки растения, и так трансформированная растительная клетка может быть использована обычным способом для получения трансформированного растения, которое имеет измененный фенотип из-за сайленсинга SIARF91 в определенных клетках в определенное время. В этой связи Т-ДНК вектор, включающий промотор, функционально связанный со смысловой и/или антисмысловой последовательностью SIARF9 (и, возможно 3'UTR), может быть введен в *Agrobacterium tumefaciens* и использован для трансформации растительных клеток, а затем трансформированное растение может быть восстановлено из трансформированных клеток растений с использованием процедур, описанных, например, в EP 0116718, EP 0270822, PCT публикации WO 84/02913 и опубликовано в заявке на европейский патент EP 0242246 и в et al. (1991, *Plant Physiol.* 95, 426-434). Конструкция Т-ДНК вектора для *Agrobacterium*, опосредованной растительной трансформацией, хорошо известна в уровне техники. Т-ДНК вектор может быть либо бинарным вектором, как это описано в EP 0120561 и EP 0120515 или совместно интегрированным вектором, который можно интегрировать в *Agrobacterium* Ti-плазмиду гомологичной рекомбинации, как описано в EP 0116718.

Предпочтительные векторы Т-ДНК содержат промотор, функционально связанный с сайленсингом гена SIARF9 между Т-ДНК пограничной последовательности, или, по меньшей мере, расположен слева от правой пограничной последовательности. Пограничная последовательность описана в Gielen et al. (1984, *EMBO J.* 3, 835-845). Конечно, другие виды векторов могут быть использованы для трансформации растительной клетки, используя процедуры, такие как прямой перенос генов (как это описано, например, в EP 0223247), опосредованная пылью трансформация (как это описано, например, в EP 0270356 и WO 85/01856), трансформация протопластов, как, например, описанный в US 4684611, растительный РНК вирус-опосредованной трансформации (как это описано, например, в EP 0067553 и US 4407956), липосомо-опосредованной трансформации (как описаны, например, в US 4536475), и другие методы, такие как те описанные методы для трансформации некоторых линий кукурузы (например, US 6140553; Fromm et al., 1990, *Bio/Technology* 8, 833-839; Gordon-Kamm et al., 1990, *The Plant Cell* 2, 603-618) и рис (himamoto et al., 1989, *Nature* 338, 274-276; Datta et al. 1990, *Bio/Technology* 8, 736-740) и метод трансформации однодольных (PCT публикация WO 92/09696). Трансформация хлопка описана в WO 00/71733, а трансформация риса и методы - WO 92/09696, WO 94/00977 и WO 95/06722. Трансформация сорго описана, например, у Jeoung J.M. et al. 2002, *Hereditas* 137: 20-8 или Zhao Z.Y. et al. 2000, *Plant Mol. Biol.* 44:789-98). Трансформация томата или табака описана также в An G. et al., 1986, *Plant Physiol.* 81: 301-305; Horsch R.V. et al., 1988, In: *Plant Molecular Biology Manual A5*, Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, стр. 1-9; Koornneef M. et al., 1986, In: Nevins D.J. and R.A. Jones, eds. *Tomato Biotechnology*, New York, NY, USA, Alan R. Liss, Inc. стр. 169-178). Трансформация картофеля описана, например, Sherman и Bevan (1988, *Plant Cell Rep.* 7: 13-16). Трансформация томатов и регенерация может осуществляться по De Jong et al. (2008) *Plant Journal* 57:160-170 и Sun et al. (2006) *Plant Cell Physiol.* 47: 426-431.

Кроме того, селекция и регенерация трансформированных растений из трансформированных клеток хорошо известны в уровне техники. Очевидно, что для разных видов и даже разных сортов или сортов одного вида протоколы специально приспособлены для регенерации трансформированных клеток на высоких частотах.

Кроме того, трансформация ядерного генома, а также трансформация пластидного генома, предпочтительно генома хлоропластов, включены в изобретение. Одно из преимуществ пластидной трансформации генома в том, что риск распространения трансгена(ов) может быть уменьшен. Пластидная трансформация генома может быть осуществлена, как известно в уровне техники, см., например, Sidarov V.A. et al. 1999, *Plant J.* 19: 209-216 или Lutz K.A. et al. 2004, *Plant J.* 37(6):906-13.

Любое растение может быть подходящим реципиентом, например однодольные или двудольные растения, но наиболее предпочтительно растения, которые выиграют от того, что имеют более крупные

плоды, такие как, но не ограничиваясь ими: томат, перец, огурец, баклажан, дыня, арбуз, тыква, виноград и многие другие, например, кукуруза, пшеница, рис, сорго, подсолнечник, плодовые деревья, клубника, цитрусовые, фасоль, горох, соя и т.д. В общем, в данном документе в качестве хозяина указан любой вид цветущего растения, производящего съедобные плоды (в ботаническом смысле) из завязей. Наиболее предпочтительны виды с мясистыми плодами (плоды с мясистым перикарпием).

Предпочтительные реципиенты из семейства пасленовых, например виды рода *Solanum*, например томат (*S. Lycopersicum*), томатное дерево (*S. betaceum*, syn. *Cyphomandra betaceae*) и другие виды *Solanum*, такие как баклажан (*Solanum melongena*), пегино (*S. muricatum*), *cocona* (*S. sessiliflorum*) и *naranjilla* (*S. quitoense*). Семейство пасленовых также включает перцы (*Capsicum annum*, *Capsicum Frutescens*).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения реципиент - семейство *Solanaceae* или *Cucurbitaceae*. В предпочтительном варианте осуществления изобретения реципиент - род *Solanum*. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения реципиент - вид *S. lycopersicum*. Желательно, чтобы реципиент - культивируемый томат вида *S. lycopersicum*, т.е. линия или разнообразие, приносящее высокие урожаи, таких как плоды, по крайней мере, 50 г среднего веса или более, например по крайней мере 80, 90, 100, 200, 300 или даже до 600 г (томаты мясистого типа). Кроме того, маленькие виды, такие как томаты черри или коктейльные томаты охватываются, как и наполненные мякотью томаты, такие как *Nunhems* разнообразие *Intense*, например, с нехваткой геля в семенной камере. Растение-реципиент томата может быть определено или неопределено различными размерами и формами плодов, такими как тип *Roma*, тип гроздь, круглый тип. Это может быть переработанный типа томата или свежий рыночный тип. Также в данном документе охватываются как открыто-опыляющиеся растения, так и гибриды. В одном варианте осуществления изобретения растение томата - это гибрид растения F1, выращенного из гибридных семян F1. Для того чтобы создать гибридные семена F1 трансгенного растения согласно данному изобретению, могут быть созданы две инбредные родительские линии, каждая из которых содержит копии трансгена в геноме. Когда эти растения перекрестно опылялись, семена F1 были собраны, они производят трансгенные гибридные растения F1 с высокой урожайностью и крупными плодами благодаря трансгену.

Варианты, описанные в данном документе для "реципиента" растения, также относятся к нетрансгенным мутантным растениям, описанным здесь, в которых вместо трансгенов мутантный аллель *slarf9* присутствует в геноме эндогенно.

Другие подходящие реципиенты других видов овощей и различных видов сочных фруктов (виноград, персики, сливы, клубники, манго, папайя и др.). Также *Cucurbitaceae*, например дыня (*Citrullus lanatus*, *Cucumis Melo*) и огурец (*Cucumis sativus*), тыква и кабачок (*Cucurbita*) являются подходящими реципиентами. Точно также *Rosaceae* являются подходящими реципиентами, например яблоки, груши, сливы и т.д.

Также согласно настоящему изобретению представлены полевые культуры с более крупными (сайленсингом *SlARF9* или мутацией *slarf9*) или мелкими плодами (в ботаническом смысле). Например, маис/кукуруза (вида *Zea*, например, *Z. mays*, *Z. diploperennis* (*chapule*), *Zea luxurians* (*Guatemalan teosinte*), *Zea mays* subsp. *huehuetenangensis* (*San Antonio Huista teosinte*), *Z. mays* subsp. *mexicana* (*Mexican teosinte*), *Z. mays* subsp. *parviglumis* (*Balsas teosinte*), *Z. perennis* (*perennial teosinte*) и *Z. ramosa*), пшеница (*Triticum species*), ячмень (например, *Hordeum vulgare*), овес (например, *Avena sativa*), сорго (*Sorghum bicolor*), рожь (*Secale cereale*), соя (*Glycine spp*, например, *G. max*), хлопок (*Gossypium species*, например, *G. hirsutum*, *G. barbadense*), *Brassica spp.* (например, *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. rapa*, etc), рис (*Oryza species*, например, сортовая группа *O. sativa indica* или сортовая группа *japonica*), просо американское (*Pennisetum spp.* например, *P. glaucum*).

В принципе, любой вид растений сельскохозяйственных культур подходит. Хлебные злаки или культивируемые растения относятся к видам растений, которые культивируются и разводятся людьми и исключают сорняки, такие как *Arabidopsis thaliana* или дикие родственные формы, такие как томатные родственные формы и другие (хотя мутантные аллели *slarf9* могут быть получены из таких растений и перенесены в культивируемые растения методами разведения, см. дальше). Культурное растение может быть выращено для пищевых целей (например, овощные культуры и полевые культуры), или для декоративных целей. Культурные растения, как определено здесь,- это также растения, из которых непродовольственные товары получают, такие как масло для топлива, пластиковые полимеры, фармацевтическую продукцию, пробки, волокна и тому подобное.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения трансгенные растения, включающие регуляторный элемент транскрипции (в частности, промотор, как описано выше), функционально связаны с молекулой нуклеиновой кислоты, которая при транскрипции способна заставить приглушить экспрессию эндогенного гена *SlARF9* в клетках реципиента.

Конструкция химерных генов и векторов, желательно стабильное, введение сайленсинга гена *SlARF9* в геном клетки-реципиента, как правило, известны в уровне техники. Для создания химерного гена смысловая и/или антисмысловая последовательность *SlARF9* функционально связана с промотором, подходящим для экспрессии в клетке-реципиенте, используя стандартные методы молекулярной биоло-

гии. Промотор, возможно, уже может присутствовать в векторе так, чтобы нуклеиновая последовательность просто вставляется в вектор на выходе из последовательности промотора. Вектор затем используется для трансформации клеток реципиента и химерного гена, вживляют в ядерный геном или в пластид, митохондриальный геном или геном хлоропластов, и выражается там с помощью подходящего промотора (например, Mc Bride et al., 1995 *Bio/Technology* 13, 362; US 5,693, 507).

Полученное трансформированное растение может быть использовано в обычной схеме селекции для получения более трансформированных растений с теми же характеристиками или ввести часть гена в другие разновидности одного и того же или родственных видов растений. Может быть выбрано "элитное событие", это трансформация с трансгеном, вставленным в определенном месте в геноме, что приводит к хорошей экспрессии желаемого фенотипа (например, оптимальному сайленсингу и более крупным плодам).

Трансгенные растения или их части, в которых приглушен SIARF9, имеют более крупные плоды, предпочтительно со значительно большим количеством клеток и/или клеточных слоев и/или значительно меньшим количеством клеток в ткани перикарпия. Значительно более крупные плоды (как описано выше) относятся в данном документе к большей средней массе плода и/или (дополнительно) диаметру плода и/или объему плода по сравнению с контрольными растениями. Массу плода можно, например, сравнивать в конце фазы роста плода, когда плод вырос до своего конечного размера. Диаметр легко измеряется у круглых плодов, у плодов другой формы - сложнее. Объем плода легко определить, например, измерив объем жидкости (например, воды) в контейнере, перемещенном плодами, либо другими методами.

Известно, что, когда мутантные растения анализируются на их фенотип, контрольные растения предпочтительно находятся около изогенных линий мутанта, который включает в себя дикий тип аллеля(ей).

В конце концов, полевые испытания используются, чтобы показать, что трансформированные клетки (или мутантные растения описаны ниже), имеют значительно более крупные плоды по сравнению с растениями дикого вида.

Как уже упоминалось, могут быть выбраны трансформированные клетки с оптимальным уровнем сайленсинга, например путем анализа количества копий (Саузерн-Блоттинг), транскриптных уровней мРНК (например, RT-PCR с использованием пары праймеров SIARF9), либо путем анализа наличия и/или уровня белков SIARF9 в различных тканях (например, SDS-PAGE, ELISA анализы и т.д.). Оптимальные трансгенные линии затем используются для дальнейшего получения пересечения/обратного скрещивания/самоопыления до высокой исполнительской элитной линии со стабильным трансгеном.

Трансформированные клетки, выражающие один или несколько генов SIARF9 (или гены сайленсинга) согласно данному изобретению, могут также содержать другие трансгены, такие как гены с засухоустойчивостью или с устойчивостью к биотическим или абиотическим стрессам, гербицидам и т.д. Для получения таких растений с "уложенными" трансгенами, другие трансгены могут быть либо интродуцированы в трансформированные клетки SIARF9, либо трансформированные клетки могут быть преобразованы в дальнейшем с одним или несколькими другими генами, или же несколько химерных генов могут использоваться для преобразования растительной линии или разновидности. Например, несколько химерных генов могут присутствовать на одном векторе или на различных совместно трансформированных векторах. Кроме того, в растение могут вводиться несколько химерных генов (см., например, Yu et al. 2007, *PNAS* 104: 8924-9 и Houben and Schubert 2007, *Plant Cell* 19: 2323-2327).

Целые растения, семена, клетки, ткани и потомства (такие как, семена F1, F2/растения и т.п.) любого из трансформированных растений, описанных выше, представлены в данном документе и могут быть идентифицированы наличием трансгенов в ДНК, например, PCR-анализом. Кроме того, могут быть разработаны "специфические линии" PCR диагностических методов, где PCR праймеры основаны на фланкирующей ДНК растения вставленного химерного гена, см. US 6563026. Подобным образом могут быть разработаны конкретные линии AFLP пептидной карты или RFLP пептидные карты, которые определяют трансгенное растение или любое растение, семена, ткани или клетки, полученные из них.

Известно, что трансгенные растения согласно данному изобретению не показывают нежелательный фенотипы, такие как снижение качества плодов, меньше плодов на растении, усиленная восприимчивость к болезням и нежелательным структурным изменениям (карликовость, деформация) и т.д., и что, если такие фенотипы проявляются в первичных трансформированных клетках, они могут быть удалены обычным методом для разведения и селекции (скрещивание/обратное скрещивание/самоопыления и т.д.). Любое из трансгенных растений, описанных в данном документе, может быть гомозиготным или гемизиготным для трансгена.

Нетрансгенные растения с более крупными плодами и методов их получения.

Случаем реализации данного изобретения также является использование нетрансгенных методов, например систем поколения мутантов-мишеней поколения и идентификации, таких как TILLING подход (Targeting Induced Local Lesions IN Genomics; McCallum et al., 2000, *Nat. Biotech.* 18:455, и McCallum et al. 2000, *Plant Physiol.* 123, 439-442, Henikoff et al. 2004, *Plant Physiol.* 135: 630-636 включены в данный документ по ссылке) и селекция для получения растительных линий, которые включают по меньшей мере одну мутацию в эндогенном аллеле SIARF9 и в котором растения, составляющие мутантный аллель

slarf9 в гетерозиготных или гомозиготных формах, имеют значительно более крупные плоды по сравнению с растениями с нехваткой мутантного аллеля (с аллелем дикого вида(ов) в локусе SlARF9). Таким образом, в одном варианте осуществления настоящего изобретения, растения, содержащие один или несколько мутантных аллелей slarf9 в геноме и значительно более крупные плоды по сравнению с растениями с отсутствующим указанным мутантным аллелем (ями), но включающие аллели дикого вида вместо этого, представлены в настоящем документе, а также части растений (например, собранные плоды, собранные листья и т.д.), семена, клональное разведение таких растений, потомство таких растений, составляющих мутантный аллель.

"Плоды большего размера" в данном документе относится к значительно большему размеру плода (в среднем), по сравнению с подходящими контрольными растениями (например, растениями дикого типа), т.е. средний экваториальный диаметр и/или средний объем и/или средняя масса свежего плода значительно больше, чем у контрольных растений. Размер плода предпочтительно определяется в конце фазы роста плода, либо после нее (т.е. у плода, достигшего конечного размера). Например, размером плода томата по меньшей мере около 5, 8, 10, 15, 20 или большим количеством плодов на растении можно определить путем измерения средней сырой массы плода в конце фазы роста (например, молочная стадия) и/или измерения среднего экваториального диаметра, а также путем сравнения объемов с контрольными растениями (плоды растений, включающих аллели SlARF9 дикого типа в их геноме). Растения, имеющие значительно более крупные плоды, производят, например, плоды со средней массой, по меньшей мере, около 105, 110, 115, 120, 130, 140, 150% или больше от контрольных плодов. Дополнительно или в противном случае средний экваториальный диаметр составляет по меньшей мере около 105, 110, 115, 120% или более от экваториального диаметра контрольных плодов.

Кроме того, количество клеток и/или клеточных слоев в ткани перикарпия значительно возросло и/или размер клетки значительно меньше по сравнению с контрольными растениями (например, плоды дикого типа), как описано в другом документе.

Без ограничения настоящего изобретения считается, что плоды растений, включающих мутантные аллели slarf9, кодирующие белок SlARF9 с нефункциональной или сниженной функцией, значительно более крупные и имеют большее количество клеток, благодаря ускоренной фазе клеточного деления развития плода (т.е. в период фазы клеточного деления развития плода, например, в томате в первые 10-14 дней после оплодотворения).

Предпочтительно, растения с более крупными плодами, как описано выше, являются гомозиготными для мутантного аллеля slarf9, несмотря на то что гомозиготные растения могут также производить более крупные плоды. Для создания растений, включающих мутантный аллель в гомозиготной форме, самоопыление может быть использовано, при необходимости в сочетании с генотипированием (определяя наличие мутантного аллеля, например, PCR методом с использованием специфических праймеров аллеля и/или последовательности). Если TILLING подход используется мутантными растениями (M1) предпочтительно самоопыленные один или несколько раз для создания, например, M2 популяции или, предпочтительно, M3 или M4 популяции для фенотипа. В популяциях M2 мутантный аллель находится в соотношении 1 (гомозиготный для мутантного аллеля): к 2 (гетерозиготный для мутантного аллеля): 1 (гомозиготный для аллеля дикого типа). Сегрегация размера плодов должна коррелировать с сегрегацией мутантного аллеля.

Растение, включающее мутантный аллель slarf9, или его вариант, со значительно более крупными плодами может быть любого вида, как томатная последовательность, указанная в настоящем документе, может быть использована для создания и определения растений, включающих мутации в гомологах и ортологах гена, как описано ниже. Эндогенный вариант SlARF9 последовательности нуклеиновой кислоты в растении может быть идентифицирован, который затем может быть использован в качестве целевого гена в поколении и/или идентификации растений, включающих вариант SlARF9 мутантного аллеля. Таким образом, мутантное растение (т.е. растение, включающее мутантный аллель slarf9) может быть двудольного и однодольного вида. Предпочтительно, растение - это культурное растение, хотя это также случай реализации для определения мутантных аллелей в диких растениях или некультурных растениях и передачи этих методов путем селекции в культурные растения.

В одном варианте осуществления изобретения растение, содержащее по меньшей мере один мутантный аллель slarf9 (в гомозиготной или гетерозиготной форме) и имеющее значительно более крупные плоды, относится к семейству Solanaceae, т.е. охватывающий рода Solanum, Capsicum, Nicotiana и другие или Cucurbitaceae (включающее виды Cucumis, такие как дыня и огурец). В другом варианте осуществления изобретения растения рода Solanum, например охватывающие культивируемые томаты, картофель, баклажаны и другие.

В особом случае варианта осуществления изобретения растение из вида *S. lycopersicum*. Любой *S. lycopersicum* С. может быть создан и/или определен по меньшей мере одним мутантным аллелем slarf9 в своем геноме и в результате может производить более крупные плоды. Растение томата может, таким образом, быть любым культивируемым томатом любого коммерчески сорта, любой линии разведения или иначе, это может быть определенным или неопределенным, открыто опыляющимся или гибридом, производящим плоды любого цвета, формы и размера. Мутантный аллель, генерируемый и/или опреде-

ленный, в частности, в растении томатов, или относительно совместим для скрещивания томата, может быть легко перенесен в любое другое растение томата путем разведения (скрещивание с растением, включающим мутантный аллель, а затем выбор потомства, включающим мутантный аллель).

Растение может быть любого вида семейства Solanaceae или рода Solanum, вид которого либо мутировавший для генерирования мутантного аллеля (например, TILLING подход или другие методы) или в котором одна или несколько физических или спонтанных мутаций в гене *slarf9* (или вариант) определены, например, Escotilling подходом.

Также в варианте осуществления изобретения использование нуклеазы "цинковые пальцы" для создания мутаций в эндогенных генах *SlARF9*, как описано в Townsend et al. 2009, Nature 459: 442-445 и Shukla et al. 2009, Nature 459: 437-441.

Мутантный аллель, представленный в одном варианте осуществления изобретения, генерирован или определен в культурных растениях, но также может быть получен и/или определен в диких растениях или некультивируемых растениях, а затем перенесен в культурные растения с использованием, например, скрещивания и селекции (возможно использование межвидовых скрещиваний, например, со спасением зародыша для переноса мутантного аллеля). Таким образом, мутантный аллель *slarf9* может быть генерирован (человечески-индуцированная мутация, использующая методы мутагенеза, чтобы мутагенизировать ген-мишень *slarf9* или его вариант) и/или определен (спонтанный или природный вариант аллеля) в другие виды Solanum, включающие, например, дикие родственные виды томата, такие как *S. cheesmanii*, *S. chilense*, *S. habrochaites* (*L. hirsutum*), *S. chmielewskii*, *S. Lycopersicum*, *S. peruvianum*, *S. glandulosum*, *S. hirsutum*, *S. minutum*, *S. parviflorum*, *S. pennellii*, *S. peruvianum*, *S. peruvianum* var. *humifusum* и *S. pimpinellifolium*, и затем перенесен с помощью традиционных техник разведения в культурное растение Solanum, например Solanum lycopersicum. Термин "традиционные методы разведения" охватывает здесь скрещивание, самоопыление, селекцию, двойную гаплоидную производительность, спасение зародыша, слияния протопластов, перенос через мост вида и т.д., как известно селекционеру, т.е. методы, отличающиеся от генетической модификации, с помощью которой аллели могут быть перенесены.

Предпочтительно, мутация(ии) в аллеле *slarf9* приводит к получению более крупных плодов на растении, по сравнению с растениями, у которых отсутствует мутантный аллель(и) (т.е. которые включают дикий тип аллеля *SlARF9*), как описано выше.

Без ограничения настоящего изобретения мутации в *SlARF9* (SEQ ID NO: 1 или ее варианты, либо в соответствующей геномной последовательности, например, геномная последовательность SEQ ID NO: 3 нуклеотиды 2005-5879 и SEQ ID NO: 4 нуклеотидов 1196-5869 или их вариантов), в результате сниженной функциональности или потери функции белка *SlARF9*, например, посредством одной базовой транзиции(ий), неправильных смысловых или несмысловых мутаций, или вставки или удаления одной или нескольких аминокислот или сдвига рамки в кодирующей последовательности, которая, в свою очередь, приводит к измененному фенотипу. Наличие и тип мутации(ий) могут быть проанализированы с помощью секвенирования генов с использованием *SlARF9* и/или специфические праймеров *slarf9*. "Значительное сокращение" функциональности белка *SlARF9*, предпочтительно, определяется косвенно в естественных условиях фенотипом (т.е. значительно более крупными плодами) в гетерозиготных растениях или, предпочтительно, гомозиготных для мутантного аллеля. Фенотип большего размера плода выделяется вместе с мутантным аллелем.

В одном варианте осуществления изобретения представлено растение (предпочтительно растение томата), в состав которого входят одна или несколько мутаций в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 (нуклеотиды 2005-5879) или SEQ ID NO: 4 (нуклеотиды 1196-5869), или в соответствующую последовательность нуклеиновой кислоты, включающей по меньшей мере около 60, 62, 65, 70, 80, 90, 95, 97, 97.5, 98, 98.5, 99% или более идентичности последовательности любой из этих последовательностей (как указано), при этом мутация в кодируемом белке *SlARF9* (или варианте) имеет сниженную активность (по сравнению с функциональным белком дикого типа) или активность в естественных условиях, при этом растение производит значительно более крупные плоды, по сравнению с растением (предпочтительно томатом), содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует дикий тип, функциональный белок *SlARF9* (или вариант).

В одном варианте осуществления изобретения растения (предпочтительно растение томата) представлено, в состав которого входят одна или несколько мутаций в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок SEQ ID NO: 2, или белок, включающий по меньшей мере 53, 54, 55, 58, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99% или более идентичности последовательности SEQ ID NO: 2 (как определено), и где (томат) растение имеет значительно более крупные плоды по сравнению с (томатом) растением с отсутствующей одной или несколькими указанными мутациями.

В одном варианте осуществления изобретения представлены растения с более крупными плодами (предпочтительно томат), включающие мутантный аллель *slarf9*, отличающийся тем, что мутации с потерей функции или сниженной функцией мутации закодированного белка *SlARF9*, указанный белок - это белок, включающий по меньшей мере 53, 54, 55, 58, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99% или более идентичности последовательности аминокислоты SEQ ID NO: 2.

Растение (например, томат), предпочтительно гомозиготное для мутантного аллеля SLARF9.

С одной стороны представлено растение *Solanum lycopersicum*, включающее мутантный аллель *slarf9* в своем геноме, в частности, аллель с одной или несколькими одноточечными мутациями, в любом экзоне SEQ ID NO: 3 (или ее вариантах), в частности в экзоне 2 и/или экзоне 7. С одной стороны, мутация в кодоне последовательности одной из следующих аминокислот: аминокислота 52, 191 и/или 193 SEQ ID NO: 2. Растения томата, включающие мутантный аллель *slarf9* и производящие более крупные плоды, у которых мутантный аллель включает одну или несколько следующих мутаций, являются вариантом осуществления настоящего изобретения (обозначая первую аминокислоту в белке дикого типа SLARF9, который преобразуется в другую аминокислоту в мутанте на позиции, указанной в нижнем индексе): Gly₅₂→Ser₅₂, Arg₁₉₁→Trp₁₉₁ или His₁₉₃→Tyr₁₉₃. С одной стороны, мутация в последовательности, кодирующей консервативный домен белка SLARF9, в частности, в связывающем домене ДНК b3, т.е. аминокислоты 74-236 SEQ ID NO: 2 или их вариант. С одной стороны, растения томата, включающие мутантный аллель *slarf9*, получаемый из семян, обозначенных NCIMB 41827, 41828, 41829, 41839 и/или 41831 (или из растений, полученных из таких семян или потомства этих растений) представлены в данном документе, при этом плоды томата значительно крупнее плодов томата с аллелями дикого типа SLARF9 в локусе SLARF9.

В другом варианте осуществления изобретения растением, включающим эндогенный мутантный аллель *slarf9*, является арбуз, производящий более крупные плоды по сравнению с арбузом, включающим аллель дикого типа SLARF9. В еще одном варианте осуществления изобретения растение представляет собой огурец, дыня или перец.

Мутантные растения можно отличить от немутантов молекулярными методами, такими как мутация(и), присутствующие в геномной ДНК *slarf9* или РНК (кДНК), уровнях белка SLARF9 и/или активности белка, и т.д., а также измененные фенотипические характеристики по сравнению с диким типом. Мутантный аллель может быть перенесен в другие растения, которые являются совместимыми для размножения с мутантным растением, используя традиционное скрещивание и селекцию. Таким образом, мутантный аллель может быть использован для создания томата любого вида с крупными плодами, например видовое разнообразие открытого опыления, гибридные сорта, гибриды F1, вид Roma, вид cherry, определенный или неопределенный виды и т.д. В одном варианте осуществления изобретения растение (предпочтительно *S. lycopersicum*), содержащий мутантный аллель *slarf9* и более крупные плоды, это гибрид растения F1 или семена F1, из которых выращивается растение F1 гибрид. Для получения гибрида F оба инбредных родителя включают один и тот же мутантный аллель *slarf9* в своем геноме в гомозиготной форме.

В другом варианте осуществления изобретения растение, включающее мутантный аллель *slarf9* (например, томат), скрещивают с другим растением того же вида или близкородственных видов для создания гибридного растения (гибридных семян), содержащего мутантный аллель *slarf9*. Такое гибридное растение также является вариантом осуществления изобретения. Также представлен метод переноса мутантного аллеля *slarf9* на другое растение, включая предоставленное растение с мутантным аллелем *slarf9* в своем геноме, в котором мутантный аллель способствует получению более крупных плодов (как описано выше), скрещивая указанное растение с другим растением и получая семена указанного скрещивания. Выборочно, растения, полученные из этих семян, могут дополнительно самоопыляться и/или скрещиваться, и выбирается такое потомство, которое имеет в составе мутантный аллель и более крупные плоды, благодаря присутствию мутантного аллеля по сравнению с растениями, включающими аллель SLARF9 дикого типа.

В одном варианте осуществления изобретения оба родителя, чтобы получить гибрид F1, включают различные мутантные аллели *slarf9* в гомозиготной форме, так что гибрид состоит из двух различных мутантных аллелей *slarf9*. Например, родитель 1 может включать потерю функции мутанта, в то время как родитель 2 включает сниженную функцию мутанта. Гибрид F1 затем содержит один аллель каждого родителя. Таким образом, здесь также представлены растения томатов, состоящие из двух различных мутантных аллелей *slarf9* в локусе SLARF9 и имеющие более крупные С одной стороны, мутантный аллель, получаемый из семян, обозначенных NCIMB 41827, 41828, 41829, 41839 и/или 41831 (или растений, полученных из таких семян или потомства данных растений), могут быть гомозиготными в растении или могут сочетаться с аллелем дикого типа или с другим мутантным аллелем *slarf9*, например любыми аллелями, получаемых из семян, обозначенных NCIMB 41827, 41828, 41829, 41839 и/или 41831 (или из растений, полученных из таких семян или потомства этих растений). Таким образом, растение томата, включающее аллель, кодирующий мутацию Gly₅₂ → Ser₅₂, могут сочетаться с аллелем Arg₁₉₁ → Trp₁₉₁ или His₁₉₃ → Trp₁₉₃. Подобным образом, мутантные аллели, кодирующие Arg₁₉₁ → Trp₁₉₁ и His₁₉₃ → Trp₁₉₃, могут сочетаться в одном растении. Также мутантный аллель сплайс-сайт, получаемый из семян и имеющий номер доступа NCIMB 41827, может быть гомозиготным или гетерозиготным, а также сочетаться с аллелем дикого типа SLARF9 или с другим мутантным аллелем *slarf9*, таким как аллель, кодирующий мутацию Gly₅₂ → Ser₅₂, Arg₁₉₁ → Trp₁₉₁ или His₁₉₃ → Tyr₁₉₃, получаемый из семян, обозначенных NCIMB 41828, 41829, 41839 и/или 41831 (или растений, полученных из таких семян или потомства дан-

ных растений).

Растения, содержащие мутантный аллель *slarf9*, кодирующий потерю функции или снижение функции белка (например, укороченный белок в результате бессмысловой мутации белка, белок с измененной последовательностью аминокислоты, в результате чего, например, изменяется каталитический участок, видоизмененное сворачивание и т.д., например, из-за неправильной смысловой мутации, мутации сдвига рамки и/или мутации участков сплайсинга), могут быть получены и/или определены с помощью методов мутагенеза или путем скрининга природных популяций для природных вариантов в аллеле *slarf9*. В одном варианте осуществления изобретения TILLING подход используется для создания таких растений и/или определения такого мутагенеза, индуцирующего мутации, и/или EcoTILLING подход используется для определения растений, таких как дикое растение или некультивируемые растения, включая естественные (спонтанные) мутации в генах *slarf9*, которые затем могут быть переданы в культивируемые растения традиционными методами селекции. Тем не менее, в данном документе представлен любой другой способ мутагенеза может быть использован, и понимается, что оба индуцированных человеком мутанта, UV или рентгеновский мутагенез, химические мутагены и т.д., и спонтанные мутанты гена *slarf9*, генерируемые в или переносимые в культивируемые растения или сельскохозяйственные культуры традиционной селекцией. Также нацеленный мутагенез, использующий, например, эндонуклеазу "цинковые пальцы", может использоваться для мутации эндогенного гена *SIARF9*, а также для получения аллелей *slarf9*, кодирующих снижение или потерю функции белков *SIARF9* или мутации эндогенного промотора *SIARF9*, что ведет к снижению или отсутствию белка *SIARF9*, полученного, по меньшей мере, в период развития плода.

В особом варианте осуществления изобретения согласно настоящему изобретению мутантное растение (т.е. растение, включающее мутантный аллель *slarf9* - это растение другого вида, чем томат, например однодольное культурное растение, предпочтительно рис, кукуруза, пшеница или ячмень, включающее мутантный аллель *slarf9* в своем геноме, такое как арбуз, дыня, огурец, перец, тыква крупноплодная, тыква обыкновенная, земляника, фирма яблоко, персик, вишня, слива, виноград, лимон, апельсин, груша, малина, смородина, брусника и т.д. При использовании таких методов, как TILLING подход, усиление фрагмента гена-мишени может быть основано на SEQ ID NO: 1, или их фрагментах (например, с использованием специфических или вырожденных праймеров, например, разработанных на основе одного или нескольких консервативных доменов *SIARF9*), илиодин может сначала изолировать ортолог *SIARF9* и состав базового праймера на ортологичной последовательности. Праймеры для усиления фрагмента гена-мишени могут также основываться на последовательностях интронов или последовательностях границы интрона-экзона. Например, когда исследуется мутация в крупном экзоне, экзон может усиливаться с помощью двух реакций PCR и двух пар праймеров, при этом один или несколько праймеров могут находиться в последовательностях интрона, фланкирующих экзон. Следовательно, пары праймеров могут также основываться на геномной последовательности *SIARF9*, такой как описана в SEQ ID NO: 3 (особенно нуклеотиды в диапазоне с 1977 по 5940 или с 2005 по 5879) и SEQ ID NO: 4 (особенно нуклеотиды в диапазоне с 1950 по 5909 или с 1996 по 5869).

TILLING подход (ориентация индуцированных локальных повреждений в геномах) - это общий обратный генетический метод, который использует традиционные методы химического мутагенеза для создания библиотек мутировавших единиц, которые затем подвергаются высокому пропускному скринингу для обнаружения мутаций. TILLING подход сочетает химический мутагенез с мутацией скрининга групп продуктов PCR, что приводит к изоляции неправильных смысловых и бессмысловых мутантных аллелей генов-мишеней. Таким образом, TILLING подход использует традиционный химический мутагенез (например, мутагенез EMS или MNU) или другие методы мутагенеза (например, излучения, такие как UVUV), а затем скрининг с высокой пропускной способностью для мутаций в определенных генах-мишенях, таких как *SIARF9*, согласно данному изобретению. S1 нуклеазы, такие как CEL1 или ENDO1, используются 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 был применен во многих видах растений, таких 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), Brassica, кукуруза (Till et al. 2004, *BMC Plant Biol.* 4: 12), и т.д. Также EcoTILLING подход, в котором мутанты в природных популяциях не обнаружены, широко используется, см. Till et al. 2006 (*Nat. Protoc.* 1: 2465-77) и Comai et al. 2004 (*Plant J.* 37: 778-86). В одном варианте осуществления изобретения в данном документе может использоваться классический TILLING подход модифицируется, и вместо использования фермента, основанного на мутантном определении (ферментативное переваривание с одноцепочечной специфической нуклеазой и высокоразрешающим электрофорезом в полиакриламидном геле), двух различных системах высокопропускного определения, которые раньше использовались только на людях. Эти протоколы обнаружения представляют собой адаптации КЧКЭ (конформации чувствительной капиллярного электрофореза, см. Rozycka et al. 2000, *Genomics* 70, 34-40) или HRM (High Resolution Melting, см. Clin. Chem. 49, 853-860). См. Gady et al. 2009, *Plant Methods* 5:13.

Таким образом, здесь представлены нетрансгенные растения, семена и ткани, содержащие мутант-

ный аллель *slarf9* в одной или нескольких тканях и в составе одного или нескольких фенотипов, предоставляемых сниженной функцией или потерей функции белка SIARF9, согласно данному изобретению (например, более крупные плоды, как описано выше) и методы для создания и/или выявления таких растений.

Также представлен способ для создания и/или выявления мутантного аллеля *slarf9* подходит для растений, производящих более крупные плоды, и/или способ получения растения, дающего более крупные плоды, включающий следующие этапы:

(a) мутирование семян растений (например, с помощью мутагена EMS) для создания популяции M1 или предоставления мутировавших семян растений, или предоставления растений, включающих естественные вариации,

(b) выборочное самоопыление растений (a) один или несколько раз для создания M2, M3 или семейств M4,

(c) приготовление ДНК растений (a) или (b) и объединение ДНК отдельных особей или объединение образцов тканей отдельных особей и приготовления ДНК из объединенных образцов,

(d) PCR-амплификация всех или части гена-мишени SIARF9 (геномной или кДНК) или ее варианта из ДНК групп, пулов ДНК или ДНК объединенных образцов ткани,

(e) обнаружение присутствия мутировавшего аллеля(ей) *slarf9* в продуктах PCR-амплификации и тем самым в пулах ДНК или в ДНК из объединенных образцов ткани,

(f) выбор соответствующих отдельных растений, имеющих мутантный аллель(и) *slarf9*,

(g) выборочное секвенирование мутантного аллеля *slarf9* растения;

(h) фенотипирование растений (f), или их потомства для получения более крупных плодов и

(i) выращивание растений с более крупными плодами по сравнению с контрольными растениями, а также

(j) разведение с растением (i) для создания культурных растений, производящих более крупные плоды и имеющих хорошие агрономические характеристики.

Между шагами (e) и (f) можно дополнительно провести анализ SIFT для определения того, какая мутация приведет к увеличению размера плодов растений.

На этапе (d) праймеры, которые усиливают все или часть гена-мишени SIARF9 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или 4) или его варианта, разработаны с использованием стандартных методов, таких, как CODDLE (<http://www.proweb.org/dodddle>). Праймеры могут быть разработаны для усиления, например, по меньшей мере около 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 800 bp или по меньшей мере до 1000 bp или более гена-мишени, т.е. SEQ ID NO: 1, 3 или 4 или варианты SEQ ID NO: 1, 3 или 4. Предпочтительно фрагмент, содержащий весь или часть закрепленного домена белка SIARF9, усиливается праймером, например фрагмент кодирует весь или часть ДНК-связывающего домена, MR, домен димеризации III или домен димеризации IV.

Для видов растений, кроме томата, желательнее сначала определить последовательность эндогенного гена SIARF9 для того, чтобы быть в состоянии проектировать хорошие последовательности праймеров. Последовательность может быть идентифицирована *in silico* или, например, разработана вырожденными PCR праймерами и усиливающими весь или часть варианта гена SIARF9 (ортолог гена SIARF9 томата) генома растений. Последовательность эндогенного гена SIARF9 затем, предпочтительно, использована для разработки подходящих праймеров для TILLING подхода.

Этап (e) может использовать нуклеазы S1, такие как CEL1 для обнаружения несоответствия между продуктом PCR амплификации, т.е. между диким типом SIARF9 PCR продукта и мутантом *slarf9* PCR продукта, которые формируют гетеродуплексы. Кроме того, этап (e) может для обнаружения использовать CSCE или HRM. В CSCE формируются гомодуплексах (WT/WT или мутант/фрагменты мутанта) и гетеродуплексы (мутант/WT фрагменты). Из-за сформированного несоответствия гетеродуплексы мигрируют с другой скоростью, чем гомодуплексы через капилляры, что позволяет идентифицировать пулы, содержащие мутацию в пределах фрагмента-мишени. HRM также является незимной технологией. В PCR-амплификации фрагменты гена-мишени LCgreen Plus+™ молекулы включены между гибридизированной парой оснований двухцепочной молекулы ДНК, которые - когда найдены в молекуле - будут излучать флуоресценцию. LightScanner фиксирует интенсивность флуоресценции, в то время как пластинка постепенно нагревается. При определенной температуре продукты PCR начинают плавиться и выделяют LCgreen Plus+™, в которой флуоресценция уменьшается. Определены пулы ДНК, содержащие мутации (гетеродуплексы), так как их температура плавления ниже, чем у гомодуплексов.

Этап (j) может включать в себя традиционные методы разведения и фенотипические и/или маркерные методы селекции. Многие виды, которые включают один или несколько мутантных аллелей *slarf9* и производят значительно более крупные плоды по сравнению с растениями, включающими один или несколько аллелей SIARF9 дикого типа, могут быть выведены таким образом.

Были опубликованы обширные протоколы для проведения TILLING подхода, см., например, http://blocks.fhcrc.org/%7Esteveh/TILLING_publications.html и Till et al. (2006) Nature Protocols 1:2465-2477; Till et al. (2006) Methods Mol. Biol. 323:127-135 и Till et al. (2003) Methods Mol. Biol. 236:205-220, все указаны в данном документе в ссылке.

После того как растение, включающее мутантный аллель, который дает желаемый фенотип, был определен, этот аллель может быть передан другим растениям традиционными методами селекции, например, путем скрещивания растений с другим растением и сбором потомства скрещивания. На этапе (j) аллель, таким образом, может быть использован для создания растений, имеющих более крупные плоды, которые обеспечивают хорошие агрономические характеристики.

Как уже упоминалось, следует понимать, что другие методы мутагенеза и/или селекции могут также быть использованы для создания мутантных растений согласно данному изобретению. Семена могут быть, например, облучены или химически обработаны для получения мутантных популяций. Кроме того, прямое секвенирование гена *slarf9* может быть использовано для скрининга мутировавших растительных популяций для мутантных аллелей. Например, Keypoint скрининг - основанный на последовательности метода, который может быть использован для идентификации растений, включающих мутантные аллели *slarf9* ((Rigola et al. PloS One, March 2009, том 4(3):e4761).

Таким образом, представлены нетрансгенные мутантные растения, которые производят более низкие уровни (функциональные) дикого вида белка SIARF9 в одной или нескольких тканях (в частности, по меньшей мере, в ткани плода), или которые полностью лишены функционального белка SIARF9 в определенных тканях, которые производят нефункциональный белок SIARF9 в некоторых тканях, например, в связи с мутациями в одном или нескольких эндогенных аллелях *slarf9*. Эти мутанты могут быть получены с помощью методов мутагенеза, таких как TILLING подход или его вариантов, или они могут быть определены EcoTILLING подходом или любым другим способом. Аллели *Slarf9*, кодирующие нефункциональные или со сниженной функциональностью белок SIARF9, могут быть выделены, упорядочены или перенесены на другие растения традиционными методами селекции.

Представлена любая часть растения или его потомства, в том числе включая собранные плоды, собранные ткани или органы, семена, пыльцу, цветы, завязи и т.д., включающие мутантный аллель *slarf9* в геноме, согласно настоящему изобретению. Представлены все культуры клеток растения или культуры тканей растения, включающие в их геноме мутантный аллель *slarf9*. Предпочтительно, культуры клеток растения или культуры тканей растения могут быть регенерированы в целые растения, включающие геном мутантный аллель *slarf9* в своем геноме. В данном документе также указаны двойные гаплоидные растения (и семена, из которых можно вырастить гаплоидные растения), полученные путем удвоения хромосом гаплоидных клеток, включающих мутантный аллель *slarf9*, любые гибридные растения (а также семена, из которых можно вырастить гибридные растения), которые включают мутантный аллель *slarf9* в своем геноме, при этом двойные гаплоидные растения и гибридные растения производят значительно более крупные плоды, согласно настоящему изобретению.

Также представлены комплекты для определения наличия или отсутствия в растении мутантного аллеля *slarf9*, согласно настоящему изобретению. Такой комплект может включать в себя PCR-праймеры и зонды выявления аллелей в образце ткани или ДНК или РНК, полученных из данной ткани.

Предпочтительно, мутантные растения также имеют другие хорошие агрономические характеристики, т. е. они не сократили количество плодов и/или качество плода по сравнению с растениями дикого вида. Предпочтительно, урожайность таких растений высока благодаря более крупным плодам. Также большее количество клеток и/или их меньший размер в ткани перикарпия приводит к более высокому содержанию твердого вещества (больше клеточных оболочек на грамм веса сырой ткани). Таким образом, содержание растворимого и нерастворимого твердого вещества выше. В предпочтительном варианте осуществления изобретения растение - растение томата и плод - плод томата, такой как обработанный томат, свежий рыночный томат любой формы, или размера, или цвета. Таким образом, представлены также собранные продукты растений или части растений, включающие один или два мутантных аллеля *slarf9*. Это включает в себя переработанные продукты, такие как томатная паста, кетчуп, томатный сок, разрезанные плоды томата, консервированные овощи, сухофрукты, очищенные фрукты и т.д. То же самое относится к другим видам растений. Продукты можно определить по наличию мутантного аллеля в их геномной ДНК.

Другие варианты использования согласно изобретению.

Согласно настоящему изобретению представлено использование последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок SIARF9 для модификации размера плодов растений. В предпочтительном варианте осуществления изобретения подобное использование включает изменение (увеличение или снижение) уровня функционального белка в растении или в определенных частях растения (например, по меньшей мере, в плодах).

В одном варианте осуществления изобретения представлено использование последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок SIARF9 для создания трансгенных или нетрансгенных растений с более крупными плодами, характеризующихся тем, что белок SIARF9 содержит по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В данном документе подобное использование включает любое использование, включающее растения, семена или растения или клетки растения аллелем *slarf9* в геноме, согласно настоящему изобретению, с целью получения или использования более крупных плодов.

Подобным образом представлено использование последовательности нуклеиновой кислоты, коди-

рующей белок SlARF9 для увеличения размера плодов, при этом белок SlARF9 включает по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичности последовательности аминокислоты SEQ ID NO: 2.

В одном случае в данном документе представлено использование растения или семян, включающих мутантный аллель slarf9 для получения плодов большего размера, при этом аллель slarf9 представляет собой аллель, который кодирует белок, включающий по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичности последовательности аминокислоты SEQ ID NO: 2. В результате одной или нескольких указанных мутаций растение, включающее указанный мутантный аллель в своем геноме производит значительно более крупные плоды по сравнению с растением, включающим аллель SlARF9 дикого типа в своем геноме.

В другом случае в данном документе представлено использование клетки растения в искусственных условиях или культуры ткани, включающей мутантный аллель slarf9 для производства растений с более крупными плодами, при этом аллель slarf9 представляет собой аллель, который кодирует белок, включающий по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичности последовательности аминокислоты SEQ ID NO: 2. Клетки растения или культура клеток может быть регенерирована в целое растение с использованием известных методов.

Подобным образом представлено использование плодов большего размера, включающих в геноме мутантный аллель slarf9 для получения урожая, хранения, обработки или продажи, при этом аллель slarf9 представляет собой аллель, который кодирует белок, включающий по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичности последовательности аминокислоты SEQ ID NO: 2.

Также в данном документе представлено использование последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок для производства трансгенных и нетрансгенных растений, которые производят более мелкие плоды. Экспрессия белка SlARF9 увеличена, как описано в другом месте данного документа, а белок SlARF9 это функциональный белок, который включает по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичности последовательности аминокислоты SEQ ID NO: 2.

Растение, предпочтительно, рода Solanum, Capsicum или Cucumis. В одном варианте растение, предпочтительно, томат, перец, огурец или дыня.

В одном случае, мутантный аллель slarf9 представляет собой получаемые из растений, выращиваемые из семян с номером доступа NCIMB 41827, 41828, 41829, 41830 или 41831.

Таким образом, в данном документе представлено применение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный аллель slarf9, для производства нетрансгенных растений с крупными плодами, а также в одном варианте мутантный аллель slarf9 представляет собой аллель, получаемый из вышеупомянутых семян.

Последовательности

SEQ ID NO 1: последовательность кДНК аллеля SlARF9 дикого типа из томата сорта Moneymaker.

SEQ ID NO 2: белковая последовательность белка SlARF9 дикого типа, кодируемого SEQ ID NO: 1. Аминокислоты 74-236 включают полученный из В3 связывающий домен ДНК. Аминокислоты 237-564 включают средний участок (MR). Аминокислоты 256-332 включают предполагаемая область ответа ауксина. Аминокислоты 565-602 включают домен димеризации III. Аминокислотные последовательности 609-651 включают домен димеризации IV.

SEQ ID NO 3: регион промотора (нуклеотиды 1-2004) и геномная ДНК дикого типа SlARF9 томата сорта Moneymaker. Начало транскрипции (мРНК) находится на нуклеотиде 1551, а конец транскрипции на 6323, стартовым кодоном трансляции является ATG на позиции 2005-2007, терминирующим кодоном является TAA на позиции 5877-5879. Таким образом, 5' нетранслируемая область из основы с 1551 по 2004, а также 3'нетранслируемая область из основы с 5880 по 6323.

SEQ ID NO 4: регион промотора (нуклеотиды 1-1995) и геномная ДНК дикого типа SlARF9 томата сорта Heinz1706. Начало транскрипции (мРНК) находится на нуклеотиде 1543, а конец транскрипции на 6313, стартовым кодоном трансляции является ATG на позиции 1996-1998, терминирующим кодоном является TAA на позиции 5867-5869. Таким образом 5' нетранслируемая область из основы с 1543 по 1995, а также 3'нетранслируемая область из основы с 5870 по 6313.

SEQ ID NO 5: праймер актина, прямой.

SEQ ID NO 6: праймер актина, обратный.

SEQ ID NO 7: праймер SlARF9, прямой, для обнаружения мРНК.

SEQ ID NO 8: праймер SlARF9, обратный, для обнаружения мРНК.

SEQ ID NO 9: праймер SlARF9, прямой, для амплификации кодирующей последовательности.

SEQ ID NO 10: праймер SlARF9, обратный, для амплификации кодирующей последовательности.

SEQ ID NO 11: праймер SlARF9, прямой, для амплификации фрагмента РНКи.

SEQ ID NO 12: праймер SlARF9, обратный, для амплификации фрагмента РНКи.

SEQ ID NO 13: промотор праймера SlARF9, прямой, для амплификации промотора.

SEQ ID NO 14: промотор праймера SlARF9, обратный, для амплификации промотора.

SEQ ID NO 15: прямой праймер для скрининга популяций растений для мутаций в экзоне 2.

SEQ ID NO 16: обратный праймер для скрининга популяций растения для мутаций в экзоне 2.

- SEQ ID NO 17: прямой праймер для скрининга популяций растений для мутаций в экзоне 2.
 SEQ ID NO 18: обратный праймер для скрининга популяций растения для мутаций в экзоне 2.
 SEQ ID NO 19: прямой праймер для скрининга популяций растения для мутаций в экзоне 6.
 SEQ ID NO 20: обратный праймер для скрининга популяций растения для мутаций в экзоне 6.
 SEQ ID NO 21: прямой праймер для скрининга популяций растения для мутаций в экзоне 7.
 SEQ ID NO 22: обратный праймер для скрининга популяций растения для мутаций в экзоне 7.

Условные обозначения чертежей

Фиг. 1 - относительные уровни мРНК SlARF9 в период завязывания плода.

(а) Уровень экспрессии SlARF9 количественной ПЦР в реальном времени, 1, 2 и 3 дня (дн.) после обработки, в плаценте вместе с овулярной тканью и стенке завязи. Тотальная РНК была изолирована в цветках с удаленными незозревшими пестиками (контрольные растения), в цветках с удаленными незозревшими пестиками, обработанных гиббереллиновой кислотой (GA3), цветках с удаленными незозревшими пестиками после ручного опыления (Pollinat.).

(b) Относительные уровни мРНК SlARF9 в завязях томата, собранных на семи различных стадиях развития цветка. На стадиях 1-4, размеры бутона соответствовали указанным. На стадии 4 представлен цветок на этапе удаления незозревшего пестика. На стадии 5 цветок полностью раскрывается (период цветения). Для 6 стадии цветки собирались на 3 день после цветения (DAA). Для 7 стадии цветки собирались на 3 день после опыления. Стандартные погрешности указаны (n = 2).

(c) Относительные уровни мРНК SlARF9 неопыленных завязей томата на стадии цветения и завязи, собранных спустя 3 дня после ручного опыления, разрезались на образцы завязи, плаценты и ткань стенок завязи. Стандартные погрешности указаны (n = 2).

(d) Относительные уровни мРНК SlARF9 в завязях цветков томата с удаленными незозревшими пестиками, собранных спустя 6 или 24 ч после обработки ауксином (IAA). Необработанные завязи использовались в качестве контрольной группы. Стандартные погрешности указаны (n = 2).

(e) Относительные уровни мРНК SlARF9 в молодых почках, неопыленных завязях и других частях цветка, собранных из цветков на стадии удаления незозревших пестиков, опыления завязей (3 дня после опыления), а также в гипокотиле и корнях 10-дневных всходов. Стандартные погрешности указаны (n = 2).

В каждой из вышукзанных фигур (а)-(е), высшее значение было установлено на равное 1;

фиг. 2 - уровни мРНК SlARF9 в развивающихся трансгенных плодах дикого типа.

(а) Относительные уровни мРНК SlARF9 в завязях и плодах, собранных на линиях дикого типа и SlARF9-ОЕ. Стандартные погрешности указаны (n = 2). Уровни дикого типа в плодах 3-4 мм (6 дней после опыления) были установлены на 1.

(b) Относительные уровни мРНК SlARF9 в завязях и плодах, собранных на линиях дикого типа и РНКи SlARF9. Стандартные погрешности указаны (n = 2). Уровни дикого типа в плодах 3-4 мм (6 дней после опыления) были установлены на 1;

фиг. 3 - фотографии плода томата растения SlARF9-РНКи (слева) и контрольного растения дикого типа (справа);

фиг. 4 - микроснимок клеток перикарпия плода томата (10 дней после опыления) растения SlARF9-РНКи (слева) и контрольного растения дикого типа (справа).

Следующие неограничивающие примеры описывают применение генов SlARF9 и slarf9 модификации фенотипов растения. Если не указано иное в примерах, все рекомбинантные ДНК технологии осуществляется согласно стандартным протоколам, как описано в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, и Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; и в томах 1 и 2 Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA. Стандартные материалы и методы для молекулярной работы с растениями описаны в *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) by R.D.D. Craу, совместно опубликованной ООО BIOS Scientific Publications (Великобритания) и Blackwell Scientific Publications (Великобритания).

Депонирование семян.

Репрезентативный образец семян пяти мутантов томата TILLING подхода согласно примеру 3 был отложен на хранение Nunhems B.V. 14 апреля 2011 года в NCIMB Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn Aberdeen, Scotland AB21 9YA, UK), согласно Будапештскому договору, на основании экспертного решения (ЕРС 2000, Правило 32(1)). Семена были присвоены следующие депозитные номера: NCIMB 41827 (мутант 1719), NCIMB 41828 (мутант 2484), NCIMB 41829 (мутант 3175), NCIMB 41830 (мутант 6725) и NCIMB 41831 (мутант 6932).

По требованию заявителя образцы биологического материала и любого материала, полученного из него, могут передаваться уполномоченному эксперту в соответствии с Правилем 32(1) ЕРС или соответствующим законодательством стран или договорами с установленными требованиями и положениями, до тех пор пока упоминание выдачи патента, либо 20 лет с даты подачи заявления, если заявка была отклонена, отозвана или считалась отозванной.

SEQ ID NO: 1 - *Solanum lycopersicum* ARF9, кодирующая последовательность сорта Moneymaker

atggcaacta taaatgggtg gtgttatgag tctcagccga atatgaattc tccaggtaaa
aaagatgctc tgtatcatga gctatggcag ttgtgtgcag gtccagtagt tgatgttccc
agggaaaggag aaagagttta ttattttccct caaggccaca tggacaattt ggtagcatca
attaatcaag aatggatca aagagttcca tcattcaatc tcaaatcaaa ggtcctttgt
cgagttatca atagtcattt cctggctgaa gaagacaatg atgaggtcta tgtccagatc
actttgatgc cagaggcacc acatgtaccg gagccgacta ctccggatcc attaatcccg
caggatgtaa agcctagatt ccattctttc tgcaaggfcc tgacagcctc cgatacaagc
actcatggtg gattttctgt tctaaggaaa catgctaata aatgccttcc tccattggac
ttgaaccagc agactccgac ccaggaattg attgcaaaag accttcatga cgtggagtg
cgcttcaagc atatatttag aggccaacct cggagacatt tacttaccac aggggtggag
acctttgttt cttcaaagaa attagtggca ggggattctt ttgtattctt gaggggtaat
aatggacagc tgcgagttgg ggtcaaaagg cttgttcgcc agcagagctc aatgccgtca
tcgggtgatg caagccagag catgcacctt ggagtccttg ctacagcctc tcatgctgtt
acaaccaga caatgtttgt tgtttactac aaaccgagaa ccactcagtt catcgtaggc
gtcaacaat acttagaggc tcttaaacat gaatatgcag ttggcatgcg attcaaaatg
cagtttgaag ccgaaggaa tctgataga agatttatgg gcactatagt tggaaattgat
gatctttctt cacagtggaa aaattctgcg tggcgatcct tgaaggfccg atgggacgag
cctgcagcca ttgcaaggcc tgacagagtt tctccttggg aaattaaacc ttatgtgtgt
tcaattcaa atgtccttgt cccaccaacc gcagagaaga acaaaaggca tcggctacat
agtgaatca aaatatcaga acaaccttca tctcaaatg cttcggcggt ttggaatcct
tcccttcgat cgcctcagtt taacacctt ggcatcaaca gcagtactaa ttgcgcatta
gcttctctta cagagagtgg ttggcagctt cctcatttaa atacttcagg tatgcttgtg
gatgagccag aagacggtag gactgctcca acttgggtgt gttttccatg cgttttggcc
ccgagttcg gtcaaggac taatcagccg attgttattc ctactgatgg gagaaaatgt
gataccaaaa aaacctgtag attatttggg attgacttga aaagtctctc aattagcact
actgagcagc gactacagct acagccagcc ggcatttctt gtgtctttgc agagagagca
cctccaaaca cgggtcctgc tggtgattca gatcaaaagt ctgagctttc agtagacttc
aaagatcaaa tgcaaggcca tttgcggtta cccctaaagg aggttcaaaag caagcagagt
tgttccacca ggtctcgcac aaagggtgcaa atgcaaggcg tagctgtagg tcgtgcagtg
gatttaacca tattgaaagg atacgatgag cttacaaagg agcttgagga gatgtttgaa
atccaaggag agcttcagtc acgacagaaa tgggggatct tgtttacaga tgatgaaggg
gatacaatgc ttatgggtga ttatcctgtg caagactttt gcaatgtggt gaggaagatt
ttcatttgtt caagtcagga tatgaaaaaa ttgaccctgt ctgcgcagca ccattaa

SEQ ID NO: 2 - Solanum lycopersicum ARF9 белок сорта Moneymaker;
домен (74)...(236) производный В3 ДНК-связывающий домен;
домен (237)...(564) средний участок (MR);
домен (256)...(332) область ответа ауксина, часть среднего участка (MR);
DOMAIN (565)...(602) домен димеризации III;
DOMAIN(609)...(651) домен димеризации IV.

Met	Ala	Thr	Ile	Asn	Gly	Trp	Cys	Tyr	Glu	Ser	Gln	Pro	Asn	Met	Asn
1		5		10			15								
Ser	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Ala	Leu	Tyr	His	Glu	Leu	Trp	Gln	Leu	Cys
		20		25			30								
Ala	Gly	Pro	Val	Val	Asp	Val	Pro	Arg	Glu	Gly	Glu	Arg	Val	Tyr	Tyr
		35		40			45								
Phe	Pro	Gln	Gly	His	Met	Glu	Gln	Leu	Val	Ala	Ser	Ile	Asn	Gln	Glu
		50		55			60								
Met	Asp	Gln	Arg	Val	Pro	Ser	Phe	Asn	Leu	Lys	Ser	Lys	Val	Leu	Cys
		65		70			75		80						
Arg	Val	Ile	Asn	Ser	His	Phe	Leu	Ala	Glu	Glu	Asp	Asn	Asp	Glu	Val

030460

85 90 95
 Tyr Val Gln Ile Thr Leu Met Pro Glu Ala Pro His Val Pro Glu Pro
 100 105 110
 Thr Thr Pro Asp Pro Leu Ile Pro Gln Asp Val Lys Pro Arg Phe His
 115 120 125
 Ser Phe Cys Lys Val Leu Thr Ala Ser Asp Thr Ser Thr His Gly Gly
 130 135 140
 Phe Ser Val Leu Arg Lys His Ala Asn Glu Cys Leu Pro Pro Leu Asp
 145 150 155 160
 Leu Asn Gln Gln Thr Pro Thr Gln Glu Leu Ile Ala Lys Asp Leu His
 165 170 175
 Asp Val Glu Trp Arg Phe Lys His Ile Phe Arg Gly Gln Pro Arg Arg
 180 185 190
 His Leu Leu Thr Thr Gly Trp Ser Thr Phe Val Ser Ser Lys Lys Leu
 195 200 205
 Val Ala Gly Asp Ser Phe Val Phe Leu Arg Gly Asn Asn Gly Gln Leu
 210 215 220
 Arg Val Gly Val Lys Arg Leu Val Arg Gln Gln Ser Ser Met Pro Ser
 225 230 235 240
 Ser Val Met Ser Ser Gln Ser Met His Leu Gly Val Leu Ala Thr Ala
 245 250 255
 Ser His Ala Val Thr Thr Gln Thr Met Phe Val Val Tyr Tyr Lys Pro
 260 265 270
 Arg Thr Thr Gln Phe Ile Val Gly Val Asn Lys Tyr Leu Glu Ala Leu
 275 280 285
 Lys His Glu Tyr Ala Val Gly Met Arg Phe Lys Met Gln Phe Glu Ala
 290 295 300
 Glu Gly Asn Pro Asp Arg Arg Phe Met Gly Thr Ile Val Gly Ile Asp
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Ser Gln Trp Lys Asn Ser Ala Trp Arg Ser Leu Lys Val
 325 330 335
 Arg Trp Asp Glu Pro Ala Ala Ile Ala Arg Pro Asp Arg Val Ser Pro
 340 345 350
 Trp Glu Ile Lys Pro Tyr Val Cys Ser Ile Pro Asn Val Leu Val Pro
 355 360 365
 Pro Thr Ala Glu Lys Asn Lys Arg His Arg Leu His Ser Glu Ile Lys
 370 375 380
 Ile Ser Glu Gln Pro Ser Ser Ser Asn Ala Ser Ala Val Trp Asn Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Arg Ser Pro Gln Phe Asn Thr Phe Gly Ile Asn Ser Ser Thr
 405 410 415

Asn Cys Ala Leu Ala Ser Leu Thr Glu Ser Gly Trp Gln Leu Pro His
 420 425 430
 Leu Asn Thr Ser Gly Met Leu Val Asp Glu Pro Glu Asp Gly Arg Ser
 435 440 445
 Ala Pro Thr Trp Cys Gly Phe Pro Cys Val Leu Ala Pro Gln Phe Gly
 450 455 460
 Gln Gly Thr Asn Gln Pro Ile Val Ile Pro Thr Asp Gly Arg Lys Cys
 465 470 475 480
 Asp Thr Lys Lys Thr Cys Arg Leu Phe Gly Ile Asp Leu Lys Ser Ser
 485 490 495
 Ser Ile Ser Thr Thr Glu Ala Arg Leu Gln Leu Gln Pro Ala Gly Ile
 500 505 510
 Ser Cys Val Phe Ala Glu Arg Ala Pro Pro Asn Thr Val Pro Ala Gly
 515 520 525
 Asp Ser Asp Gln Lys Ser Glu Leu Ser Val Asp Phe Lys Asp Gln Met
 530 535 540
 Gln Gly His Leu Arg Leu Pro Leu Lys Glu Val Gln Ser Lys Gln Ser
 545 550 555 560
 Cys Ser Thr Arg Ser Arg Thr Lys Val Gln Met Gln Gly Val Ala Val
 565 570 575
 Gly Arg Ala Val Asp Leu Thr Ile Leu Lys Gly Tyr Asp Glu Leu Thr
 580 585 590
 Lys Glu Leu Glu Glu Met Phe Glu Ile Gln Gly Glu Leu Gln Ser Arg
 595 600 605
 Gln Lys Trp Gly Ile Leu Phe Thr Asp Asp Glu Gly Asp Thr Met Leu
 610 615 620
 Met Gly Asp Tyr Pro Trp Gln Asp Phe Cys Asn Val Val Arg Lys Ile
 625 630 635 640
 Phe Ile Cys Ser Ser Gln Asp Met Lys Lys Leu Thr Leu Ser Arg Ala
 645 650 655
 Asp His

Примеры

Пример 1. Выделение и характеристика SIARF9.

1. 1. Материалы и методы.

1.1.1. Растительные материалы и условия роста.

Растения томатов (*Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker) выращивались, как описано в de Jong et al. (2009, *The Plant Journal* 57, 160-170). Также культура в искусственных условиях была проведена согласно протоколу в de Jong et al. (2009, *supra*). Для анализа экспрессии SIARF9 в завязях, цветах были удалены несозревшие пестики 3 дня (дн.) до периода цветения. Ручное опыление или обработка гормонами проводились в период цветения. Экспрессия SIARF9 под влиянием ауксина исследовалась в завязях цветков, обработанных 2 мкл 1 мМ 4-Cl-IAA (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com>) в 12% этанола. Обработка повторилась спустя 6 ч после первого нанесения. Контрольные растения были собраны в период цветения.

Для анализа экспрессии в трансгенных линиях была собрана ткань перикарпия из завязей и плодов, которые сформировались вторым поколением (T2) линий SIARF9-OE lines (сверхэкспрессирующие линии), а также первым поколением (T1) линий РНКи SIARF9. Все собранные ткани были заморожены в N2 и хранились при температуре -80°C до извлечения РНК.

1.1.2. Количественная ПЦР в реальном времени.

Тотальная РНК была извлечена из замороженных тканей растения томата с использованием NucleoSpin® набора растения РНК (Macherey-Nagel, <http://www.macherey-nagel.com>) и обработана RNasefree DNase I (Fermentas, <http://www.fermentas.com>). Тотальная РНК без ДНК (400 нг) использовалась в качестве матрицы для синтеза кДНК (набор синтеза кДНК template, Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com>).

Для количественной ПЦР в реальном времени 5 мкл 25-кратная растворенная ДНК использовались в 25 мкл реакции ПЦР, содержащей 400 нМ каждого праймера и 12,5 мкл iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Реакции ПЦР проводились в 96-well iCycler (Bio-Rad), с программой температуры, начинающейся с 3 мин при 95°C, затем 40 циклов по 15 с при 95°C и 45 с при 60°C. В конце температура плавления продукта должна определять специфику амплифицированного фрагмента.

Праймеры, использованные для количественной ПЦР в реальном времени, были разработаны с помощью компьютерной программы ((Beacon Designer 5.01, Premier Biosoft International,

<http://www.premierbiosoft.com>), как указано ниже.

Прямой праймер слактина

5'-GGACTCTGGTGATGGTGTAG-3' (SEQ ID NO: 5)

Обратный праймер слактина

5'-CCGTTTCAGCAGTAGTGGTG-3' (SEQ ID NO: 6)

Прямой праймер SIARF9

5'-CGTAGGCGTCAACAAATACTTAGAGG-3' (SEQ ID NO: 7)

Обратный праймер SIARF9

5'-TCCACTGTGAAGAAAGATCATCAATTCC-3' (SEQ ID NO: 8)

Пара праймера SIARF9 амплифицирует 146 фрагмент нуклеотида транскрипта мРНК SIARF9 (нуклеотиды 834-979 SEQ ID NO: 1).

1.1.3. Выделение геномных последовательностей SIARF9.

Для структурной характеристики SIARF9 несколько продуктов ПЦР амплифицировали на геномном томаты ДНК, изолированном из молодой ткани листа. Праймеры, полученные из кодирующей последовательности SIARF9 (Genbank номер доступа BT013639). Продукты ПЦР были полностью упорядочены и выравнены для получения информации о структуре экзон-интрона SIARF9. Геномная последовательность представлена в SEQ ID NO: 3. Геномная последовательность сорта Heinz 1706 (SEQ ID NO: 4) была получена из базы данных SGN, скелет 03sc03144 (<http://solgenomics.net>).

Прогулка по геному (Универсальный набор для прогулки по геному, BD бионауки, <http://www.bdbiosciences.com>) на SnaI (Fermentas) библиотека геномной прогулки с использованием генноспецифического праймера

5'-TTCTTCAGCCAGGAAATGACTATTGATAACTCG-3' (обратный),

а также внутренний праймер

5'-GGAGAATTCATATTCGGCTGAGAC-3' (обратный),

что привело к выделению 3 kb фрагменту, включающему промотор SIARF9 (указанный в SEQ ID NO: 3, выше кодона ATG). Система The Erase-a-Base (Promega, <http://www.promega.com>) использовалась для получения субклона, содержащего прогрессивные однонаправленные делеции данного фрагмента. Следовательно, данные субклоны были упорядочены и выстроены, с использованием ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>).

1.1.4. Растительная трансформация.

Для получения сверхэкспрессирующих линий SIARF9 (OE), кодирующая последовательность SIARF9 (прямая

5'-CACCATGGCAACTATAAATGGGTGGTG-3'

(SEQ ID NO: 9), обратная

5'-TTAACTGTCTGCGCGAGACAGGG-3'

SEQ ID NO: 10) была клонирована в pENTR™/D-TOPO исходный вектор (Invitrogen). Данный клон был рекомбинантным с бинарным вектором pGD625 (Dr S. de Folter, Wageningen University, Нидерланды), в котором вирус мозаики цветной капусты (CaMV) промотор 35S был заменен на завязь и молодой специфический промотор плодов TPRP-F1 (Carmi et al., 2003, supra) M. Busscher (Plant Research International, Нидерланды).

Для получения линий РНКи SIARF9, фрагмент кДНК среднего участка SIARF9 (аминокислоты 367-506, прямой

5'-AAAAAGCAGGCTGTCCCACCAACCGCAGAGAAGAAC-3'

SEQ ID NO: 11;

обратный

5'-AGAAAAGCTGGGTGCTGTAGTCGTGCCTCAGTAGTGC-3'

SEQ ID NO: 12) клонировали в исходный вектор pDONR™221 (Invitrogen), который затем был рекомбинирован с бинарным вектором pK7GWIWG2(I) (Karimi et al., 2002, Trends in Plant Sciences 7, 193-195) как в смысловой, так и антисмысловой ориентации согласно регуляции транскрипции промотора CaMV 35S и терминатора.

Для получения линий pSIARF9::GUS, фрагмент промотора SIARF9 (2200 bp, прямой

5'-CACSTTTTCAAAGAGGTGTGACATTTTCAATAAC-3'

SEQ ID NO: 13; обратная

5'-CAACSTTCAATTCCAAAACTAAAGAACACCC-3'

SEQ ID NO: 14) была клонирована в pENTR™/D-TOPO исходный вектор. Данный исходный клон был рекомбинантным с конечным вектором pKGWFS7 (Karimi et al., 2002, supra).

Трансгенные растения томатов были генерированы путем *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации, как описано в de Jong et al. (2009, supra). Также выращивается на камамицин содержащее вещество, возможные выпуски были обнаружены ПЦР с праймерами, специфически для канамицин устойчивого гена (прямой

5'-GACTGGGCACAACAGACAATCG-3',

обратный

5'- GCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGG-3')

на геномной ДНК.

Следовательно, линии тестировались на тетраплоидию, так как только диплоидный линии использовались для дальнейшего анализа.

1.1.5. Гистохимический анализ активности GUS.

Ткани взрослых растений первого поколения (T1) и 15 дневные всходы (T2) растения линий pSIARF9::GUS были погружены в GUS-окрашенный буфер, содержащий 0,1% Тритон X-100, 0,5 мМ Fe²⁺+CN, 0,5 мМ Fe³⁺+CN, 10 мМ EDTA, 1 мг мл⁻¹ X-Gluc, 0,1 мг мл⁻¹ в 50 мМ фосфатный буфер, pH 7.0. После инкубации при 37°C ткани прочистили 70% этанолом и исследовали под стереомикроскопом (Leica MZFL III, Leica Microsystems, <http://leica-microsystems.com>). Для более подробного анализа боковых корней и семяпочек световой микроскопией, GUS-помеченные ткани были вложены в Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, <http://www.heraeus-kulzer.com>). Вложенные ткани были разрезаны на секции в 5 мкМ. Секции боковых корней были контрастно окрашены 0,5% сафранином, затем частично обесцвечены 70% этанолом. Секции были изучены под микроскопом Leitz Orthoplan (микросистемы Leica). С помощью цифровой фотокамеры Leica были сделаны фотографии (модель DFC 420C; микросистемы Leica).

1.1.6. Квалификационная методология площади клетки и количество клеточных слоев.

Ткани перикарпия плодов 7-8 мм в диаметре фиксировались в 2% глутаральдегида, 0,1М фосфатном буфере растворе pH 7,2 на ночь при температуре 4°C. Следовательно, ткани дегидратировались в серии этанола и помещены в Spurr. Секции 1 мкМ окрашивались в растворе толуидинового синего (0,1% в 1% бура).

Ткань перикарпия созревшего плода на молочной стадии фиксировался в FAA (5% уксусная кислота, 3,7-4,1% раствора формальдегида и 50% этанола), дегидратирована в серии этанола и затем помещена в Technovit. Секции 5 мкМ окрасили в растворе толуидинового синего. Секции были изучены под микроскопом Leitz Orthoplan (микросистемы Leica), а также были сделаны микроснимки цифровой камерой (модель DFC 420C; микросистемы Leica). Данные микроснимки использовались для дальнейшего анализа.

Для анализа 7-8 мм плодов поперечные сечения 0,16 мм были разграничены и расположены примерно в 0,1 мм от внутреннего перикарпия, включая эпидермальные слои. Для анализа созревших плодов, секции в 9 мм были разграничены и расположены примерно в 1 мм от внутреннего перикарпия. Затем было подсчитано общее количество клеток в данных квадратах. Были включены клетки, расположенные в секциях для 2/3 их размера или более. Для оценки количества клеточных слоев в перикарпии, линия была проведена поперек секций перикарпия, а также было отмечено число клеточных слоев вдоль данной линии, включая клеточные слои эпидермиса, экзокарпия, мезокарпия и эндокарпия. В общей сложности был изучен 1 участок на каждом плоде и 5 плодов на линии.

1.2. Результаты.

1.2.1. Экспрессия SIARF9 в томате.

Относительные уровни транскрипции SIARF9, увеличенные в течение 2 дней после опыления, но не после обработки растительным гормоном гиббереллиновой кислоты (GA3). SIARF9 был экспрессирован в плацентарных и овулярных тканях, а также в стенке завязи. См. количественная ПЦР в реальном времени фиг. 1a.

Анализ мРНК завязи, собранной на различных стадиях развития цветка, показал, что транскрипт SIARF9 также присутствовал в избыточном количестве на ранних этапах развития цветка, однако снизилось на последних стадиях, в период цветения имеет низшее значение (фиг. 1b). Уровень транскрипции SIARF9 остался низким, если успешное опыление и оплодотворение не произошло. Данные процессы усилили уровни транскрипции SIARF9, в основном, в плацентарной ткани и стенке завязи (схема 1c).

Несмотря на то что обработка GA неопыленных созревших завязей не имела эффекта, использование ауксина (IAA) вызвало экспрессию SIARF9 (фиг. 1d), предполагая, что сам SIARF9 является чувствительным к ауксину. До сих пор было установлено, что только генные экспрессии AtARF4, AtARF19 и *Oryza sativa* ARF23 являются чувствительными к ауксину (Ulmasov et al., 1999, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 96, 5844-5849; Okushima et al., 2005, The Plant Cell 17, 444-463; Overvoorde et al., 2005, The Plant Cell 17, 3282-3300; Wang et al., 2007, Gene 394, 13-24).

В других тканях растения уровни транскрипции SIARF9 были очень низкими (фиг. 1e), предполагая, что функция SIARF9 может быть преимущественно плод-специфической.

Для более детального исследования экспрессии SIARF9 было проведено слияние SIARF9 промотора-GUS с использованием 2200 bp 5 фланкирующей последовательности кодирующая область SIARF9, перевязанная перед β-глюкуронидазой (GUS), кодирующей последовательность. Впоследствии данный конструктор pSIARF9::GUS был введен в томат *Agrobacterium*-опосредованной передачей генов. В 7 из 14 полученных независимых линиях наблюдалась экспрессия GUS в нескольких тканях, которые исследовались после гистохимического GUS окрашивания.

В плодах томата 5-6 мм диаметром, что соответствует приблизительно 8 DAP (дней после опыления), GUS окрашивание наблюдалось в перикарпии, во внешних клеточных слоях плаценты, которые

развились в гелеподобное вещество, в завязях (данные не указаны).

Микроскопическое исследование поперечных разрезов через семяпочки показало, что GUS окрашивание расположено на микрокопилярном конце зародышевого мешка. Область и участок окрашивания предполагают, что GUS не была экспрессирована самим зародышем, находящемся на 4-16 клеточной стадии развития (Al-Hammadi et al., 2003, *Plant Physiology* 133, 113-125), однако она была экспрессирована суспензором или приростом стенки, которая быстро развилась вокруг своей основы (Briggs, 1995, *Annals of Botany* 76, 429-439). GUS была также экспрессирована в железистых волосках на поверхности листа и корня, а также в аксиллярных меристемах, расположенных в ростке на в основании листьев. Кроме того, GUS окрашивание наблюдалось на кончике стержневого корня, ранних завязях бокового корня и перепосших боковых корнях. Окрашенный участок находился в зоне мерисемы кончиков корня, в перикцикле, а также в нескольких клеточных слоях паренхимы.

В целом, данные результаты показали, что активность промотора SIARF9 не ограничена плодом. Что интересно, большинство тканей, в которых данный ген транскрибирован, ткани, в которых происходит многократное клеточное деление.

1.2.2. Сверхэкспрессия и сайленсинг SIARF9 в томате.

Для изучения физиологической роли SIARF9 в завязи плода томата и его развитии были получены трансгенные линии томата, в которых ген был сверхэкспрессирован. Для производства сверхэкспрессированных линий SIARF9 (SIARF9-OE), кодирующая последовательность была привязана к промотору TPRP-F1, специфичному для завязи и молодых плодов (Carmi et al., 2003, *supra*). Из 11 полученных независимых трансгенных линий две линии SIARF9-OE с самой высокой экспрессией -4 и -5, соответственно, были выбраны для дальнейшего анализа.

В дополнение, были получены линии трансгенного томата, в которых ген SIARF9 прошел сайленсинг путем интерференции РНК (РНКи) с использованием фрагмента 420 п.о., основанного на среднем участке SIARF9 (аминокислоты 367-506). Специфичность данного фрагмента тестировалась с помощью анализа Саузерн-Блоттинга ДНК, который привел к получению одного сильного сигнала гибридизации (данные не указаны).

Фрагмент был клонирован в бинарный вектор РНКи согласно транскрипционной регуляции промотора CaMV 35S, а также был перенесен в томат путем *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. В двух из 12 полученных трансгенных линиях были снижены транскриптные уровни SIARF9. Две данные линии РНКи SIARF9 -6 и -12 использовались для дальнейшего анализа.

Анализ экспрессии SIARF9 в течение нескольких стадий раннего развития плода показал, что в диком типе относительный уровень мРНК SIARF9 быстро увеличился после опыления и оплодотворения, а также достиг высшего значения в плодах 3-4 мм в диаметре, что соответствует 6 дням после опыления. На последующих стадиях уровни транскрипта вновь снизились (фиг. 2).

В линиях SIARF9-OE транскриптные уровни SIARF9 в период цветения уже были высокими, независимо от опыления, и оставались таковыми более продолжительный период времени, по сравнению с транскриптными уровнями в плодах дикого типа (фиг. 2a).

В линиях РНКи SIARF9 уровень экспрессии SIARF9 был таким же, как в диком типе, однако общий транскриптный уровень был снижен до 40-70% (фиг. 2b).

Несмотря на то что конструктор РНКи регулировался конститутивным промотором 35S без вегетативных фенотипов, например они наблюдались в развитии корня или разветвлении ростков. Тем не менее, обе линии SIARF9-OE и РНКи SIARF9 показали чистый фенотип в развитии плода. Были изучены гистологические поперечные разрезы плодов, которые составили 7-8 мм в диаметре. Данные плоды были собраны приблизительно 10 дней после опыления, в конце фазы клеточного деления. Было определено количество клеток на единицу поверхности, а также количество клеточных слоев в перикарпии. В общем, в перикарпии выделяют три слоя: эдокарпий, мезокарпий и экзокарпий (Gillaspy et al., 1993, *supra*). В перикарпии плодов SIARF9-OE количество клеток мезокарпия на мм² оказалось значительно ниже ($P < 0,05$, критерий Стьюдента), по сравнению с числом клеток мезокарпия в плодах дикого типа, в то время как количество клеток на мм² в перикарпии линий РНКи SIARF9 было значительно выше ($P < 0,05$, критерий Стьюдента) (табл. 1). Более того, на количество клеточных слоев в перикарпии трансгенных плодов было оказано воздействие. В плодах SIARF9-OE данное количество было ниже, чем в плодах дикого типа, в то время как у плодов РНКи SIARF9 данное количество увеличилось. Тем не менее, благодаря большому разнообразию плодов данные различия не являлись статистически значительными для всех трансгенных линий (табл. 1).

Таблица 1

Определение количества клеток на единицу поверхности или количество клеточных слоев в перикарпии дикого типа, а также трансгенных плодов 7-8 мм в диаметре (10 дней после опыления)

Линия	Клетки/мм ²		Количество клеточных слоёв	
		Процентное соотношение мас. %		Процентное соотношение мас. %
Дикий тип (контрольные растения)	781 ± 50	100%	29 ± 1	100%
SIARF9-OE-4	452 ± 70 (P < 0.05)	58%	27 ± 2 (P = 0.41)	93%
SIARF9-OE-5	353 ± 88 (P < 0.05)	54%	22 ± 2 (P < 0.05)	76%
РНКи SIARF9-6	1246 ± 54 (P < 0.05)	160%	35 ± 1 (P < 0.05)	121%
РНКи SIARF9-12	1256 ± 151 (P < 0.05)	161%	32 ± 1 (P = 0.13)	110%

Данные представляют вид ± стандартная погрешность пяти плодов. Для всех измерений разница между линиями дикого типа и трансгенными линиями тестировались для определения статистического уровня значимости. P-значения (критерий Стьюдента) указаны.

В общем, данные результаты предполагают, что сверхэкспрессия SIARF9, общее количество клеток в перикарпии уменьшилось, в то время как снижение транскриптных уровней SIARF9 с помощью подхода РНКи, общее количество клеток в перикарпии увеличилось.

Анализ массы плода и диаметра созревших плодов на молочной стадии показал, что плоды линий SIARF9-OE был значительно ниже (масса P < 0,05, диаметр P < 0,05, критерий Стьюдента) чем плоды дикого типа. В противном случае, плоды линий РНКи SIARF9 были значительно больше (масса P < 0,05, диаметр P < 0,05) чем плоды дикого типа (табл. 2).

Таблица 2

Анализ массы плода, а также размер (диаметра) созревших плодов дикого типа и трансгенных плодов, собранных на молочной стадии

Линия	Масса (г)		Диаметр (мм)	
		мас. %		мас. %
Дикий тип (контрольные растения)	77 ± 3.0	100%	54 ± 0.9	100%
SIARF9-OE-4	53 ± 3.4	67%	48 ± 1.1	89%
SIARF9-OE-5	55 ± 3.6	71%	48 ± 1.2	89%
РНКи SIARF9-6	119 ± 13.3	154%	63 ± 2.5	117%
РНКи SIARF9-12	102 ± 7.2	132%	59 ± 1.4	109%

Данные представляют вид ± стандартная погрешность 5-20 плодов. Для всех измерений разница между линиями дикого типа и трансгенными линиями была статистически значима (P < 0,05, критерий Стьюдента).

Более того, микроскопный анализ показал, что количество клеточных слоев в перикарпии плодов РНКи SIARF9, а также количество клеток на единицу поверхности было выше, чем у плодов дикого типа (таблица 3). Большой размер плодов РНКи SIARF9 (см. фиг. 3) возможно вызван антиклинальным клеточным делением в перикарпии.

Микроснимки также показали, что клеток перикарпия РНКи SIARF9 плодов было не только больше, но и меньше по размеру, чем плоды дикого типа (см. фиг. 4). В табл. 3 размер клеток (поверхность

клетки) была рассчитана клетки/мм².

Таблица 3

Определение количества клеток на единицу поверхности или количество клеточных слоев в перикарпии зрелых плодов дикого типа и плодах РНКи SIARF9, собранных на молочной стадии

Линия	Клетки/мм ²	% дикого типа (мас.%)	Поверхность клетки (мм ²)	% дикого типа (мас.%)	Количество клеточных слоёв	% дикого типа (мас.%)
Дикий тип	6.88 ± 0.51	100%	0.15±0.01	100%	27 ± 2	100%
РНКи SIARF9-6	7.44 ± 0.55 (P = 0.48)	108%	0.13±0.01	87%	32 ± 3 (P = 0.20)	118%
РНКи SIARF9-12	9.60 ± 1.19 (P = 0.08)	139%	0.10±0.01	67%	33 ± 2 (P = 0.05)	122%

Данные представляют вид ± стандартная погрешность пяти плодов. P-значения (P; критерий Стьюдента) были указаны.

Обсуждение

Когда завязь трансформируется в плод после опыления и оплодотворения, индуцируется несколько генов, участвующих в цикле клетки и росте клетки (Vriezen et al., 2008, supra; Pascual et al., 2009, BMC Plant Biology 9, 67; Wang et al., 2009, The Plant Cell 21, 1428-1452). Индукция данных генов, возможно, опосредована гормонами ауксина и гиббереллина, так как обработка неопыленных завязей с ауксином, привело к образованию плодов с большим количеством клеток перикарпия, в то время как перикарпий GA-индуцированных плодов содержал меньшее количество больших клеток (Bünger - Kibler and Bangerth, 1982, supra; Serrani et al., 2007, supra). В соответствии с нашей предыдущей работой по определению генов, участвующих в завязи плода, которая показало, что экспрессия как ауксин-, так и GA-связанных генов была активирована после опыления (Vriezen et al., 2008, supra).

В данном документе мы описываем функциональный анализ гена SIARF9. В Arabidopsis, AtARF9 характеризовался как транскрипционный репрессор (Ulmasov et al., 1999 supra; Tiwari et al., 2003, supra), однако функция данного транскрипционного фактора все еще остается по большей частью неизвестной, так как большинство Т-ДНК мутантных линий вставки не проявило очевидного фенотипа (Okushima et al., 2005, supra). Тем не менее, мутантные линии с отсутствующим 3'-концом транскрипта остро реагировали после гравитостимуляции, предполагая, что AtARF9 может быть вовлечен в гравитропную сигнальную трансдукцию. Более того, было установлено, что AtARF9 экспрессируется в суспензоре эмбриона арабидопсиса и двойных выбитых линиях, в которых как ARF9, так и ARF13 были заглушены, AtARF9 необходим для контроля за развитием суспензора (Liu et al., 2008, supra).

Функция AtARF9 не связана с развитием плода Arabidopsis. До сих пор единственным известным ARF, участвующим в процессе "плод без оплодотворения" (FWF)/ARF8, так как мутантные линии fwf/arf8 сформировали партенокарпные стручки (Goetz et al., 2006, supra). У томатов трансгенные линии с сокращенными транскриптными уровнями SIARF7 также формируют партенокарпные плоды, что указывает на то, что SIARF7 выступает в качестве отрицательного регулятора завязывания плода (de Jong et al., 2009, supra). Другим единственным описанным в настоящее время членом семейства томатов ARF является развитый регулируемый ген 12 (DR12), гомолог AtARF4. Уровни мРНК DR12 увеличивались в процессе развития плода и достигли высшего уровня на ранней красной стадии плода. С помощью антисмыслового подхода понижающая регуляция данного гена воздействовала на твердость плода на красной стадии (Jones et al., 2002, supra).

В противном случае, было установлено, что SIARF9 был экспрессирован на ранних стадиях развития плода. Данные стадии соответствуют периоду, в котором рост плода во многом зависит от клеточного деления (Mapelli et al., 1978, supra; Bünger-Kibler и Bangerth, 1982, supra; Gillaspay et al., 1993, supra). Экспрессия SIARF9 была также индуцирована в неопыленных завязях, обработанных ауксином, в то время так транскриптные уровни SIARF9 не увеличились в партенокарпические плоды, сформированные после нанесения гиббереллина.

Кроме того, результаты GUS показали, что SIARF9 были также экспрессированы в других тканях растения, в которых произошло многократное клеточное деление. В целом, данные результаты предполагают, что SIARF9 регулирует активность клеточного деления.

Несмотря на то что ген SIARF9 не может считаться плод-специфическим геном, линии РНКи SIARF9 проявили только фенотип плода, указывая на то, что в других тканях растения SIARF9 может

избыточно взаимодействовать с другими членами семейства белков ARF.

Сниженные транскриптные уровни SIARF9 привели к формированию значительно больших плодов возможно, благодаря добавочному антиклинальному клеточному делению в перикарпие, в то время как увеличенные транскриптные уровни SIARF9 привели к образованию меньших по размеру плодов по сравнению с диким типом. Это указывает на то, что SIARF9 регулирует клеточное деление, т.е. белок SIARF9 является отрицательным регулятором (репрессором) клеточного деления.

Результаты, показавшие, что понижающая регуляция SIARF9 приводит к значительно более крупным плодам, по сравнению с растениями дикого типа, делает данный ген полезным для изменения размера плода в растениях, либо трансгенно, либо посредством снабжения (нетрансгенных) растений, включающих мутантные аллели *slarf9* или мутации в промоторе SIARF9, при этом транскриптные уровни SIARF9 и белковые уровни снижаются, либо исчезают.

Пример 2. Анализ промотора SIARF9 в *Arabidopsis*.

2.1. Материалы и методы.

2.1.1. Растительные материалы и условия роста.

Трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* в окружении Col-0 выращивались в стандартизированных тепличных условиях, при температуре 22°C, 16 ч на свету/8 ч в темноте. Семена, появившиеся в результате трансформации погружения, были стерилизованы путем обработки 100% этанолом в течение 1 мин, а также 2% раствором гипохлорида в течение 10 мин. После трех раз промывки стерильной дистиллированной водой семена посеяли в 1/2 культурную среду Murashige и Skoog (MS), включая витамины Gamborg B5, 0,05% (мас./об.), 0,7% (мас./об.) фитоагара, а также 20 мг L-1 канамицина, pH 5,7. После 10 дней инкубации в вегетационной камере (16 ч на свету/8 ч в темноте, при температуре 22°C), устойчивые растения были перемещены в почву. Растения томатов (*Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker) выращивались, как было описано в de Jong et al. (2009, supra). Для анализа экспрессии генов ответа ауксина, завязи цветов с удаленными несозревшими пестиками обрабатывали 2 мкл 1 мМ 4-Cl-IAA (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com>) в 2% этанола. Обработка повторилась спустя 6 ч после первого нанесения. Контрольные растения были собраны в период цветения. Собранные ткани были заморожены в N₂ и хранились при температуре -80°C до извлечения РНК.

2.1.2. Растительная трансформация.

Для получения трансгенного промотора линий *uidA* фрагменты промотора SIARF9 (2200 bp, прямой

5'-CACCTTTTCAAAGAGGTGTGACATTTTCAATAAC-3'

SEQ ID NO: 13;

обратная

5'-CAACCTTCAATTCCAAAACTAAAGAACACCC-3'

SEQ ID NO: 14) и AtARF9 (2466 bp, forward

5'-AAAAAGCAGGCTTGGTGGTGGGTTTTAAGGCATC-3'

AGAAAAGCTGGGTCACACAGTCTCTCTATCTCTCTCC-3')

были клонированы в pENTR™/D-TOPO или pDONR™221 исходный вектор (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>). Впоследствии, исходные клоны были рекомбинантными с конечными векторами pKGWFS7 (Karimi et al., 2002, Trends in Plant Sciences 7, 193-195). Данные конструкции были трансформированы в цепь *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 с использованием трансформации заморзания и оттаивания (Chen et al., 1994, Biotechniques 16, 664-670). Трансформация растений *Arabidopsis* проводилась с помощью цветочного метода окраски погружением в краситель, как описано Clough и Bent (1998, The Plant Journal 16, 735-743).

2.1.3. Проба гормонального ответа.

Для тестирования чувствительности промоторов SIARF9 и AtARF9 на ауксин 10 дневные ростки и созревшие листья линий *Arabidopsis* pSIARF9::GUS выводили в 0,05% этанола или 50 мкМ гетероауксина (IAA) в 0,05% этанола. После 3 и 9 ч ткани были заморожены в N₂ и хранились при температуре -80°C до извлечения РНК.

2.1.4. Количественная ПЦР в реальном времени.

Тотальная РНК была изолирована и обратно транскрибирована с кДНК согласно протоколу, описанному в примере 1.1.2. Также для количественной ПЦР в реальном времени были использованы такие же условия, как в примере 1.1.2. Последовательности праймеров, использованных для количественной ПЦР реального времени включают SEQ ID NO 7 и 8 для AtARF9, а также следующую последовательность для

Прямой 5'-AGAAGCCATGAGCAATAAGTTCTCTGTAGG-3'

Обратный R 5'-GGGAGCAGTCTTTTCACACCAATAACC-3'

Также для GUS (*uidA*)

Прямой 5'-CTCCTACCGTACCTCGCATTAC-3'

Обратный 5'-CCGTTGACTGCCTCTTCGC-3'

2.1.5. Гистохимический анализ активности GUS.

Ткани взрослых растений (T1) и 10 дневные всходы (T2) линий *Arabidopsis* pSIARF9::GUS и pAtARF9::GUS были погружены в GUS-окрашенный буфер, содержащий 0,1% Тритон X-100, 0,5 мМ Fe²⁺+CN, 0,5 мМ Fe³⁺+CN, 10 мМ EDTA, 1 мг мл⁻¹ X-Gluc, 0,1 мг мл⁻¹ в 50 мМ фосфатный буфер, pH 7,0. После инкубации при 37°C ткани прочистили 70% этанолом. Окрашенная ткань исследовалась под стереомикроскопом (Leica MZFL III, <http://leica-microsystems.com>). С помощью цифровой фотокамеры Leica были сделаны фотографии (модель DFC 420C; микросистемы Leica).

2.1.6. Анализ промотора in silico.

Последовательности промотора SIARF9 и AtARF9 (At4g2323980), включая 5'нетранслируемые участки данных генов, исследовались с помощью PlantCARE (Lescot et al., 2002 *Nucleic Acids Research* 30, 325-327 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) и PLACE (Higo et al., 1999, *Nucleic Acids Research* 27, 297-300, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>).

2.2. Результаты.

2.2.1. Промоторный анализ in silico SIARF9 и AtARF9.

Уровни транскрипции *Solanum lycopersicum* ARF9 (SIARF9) возросли в течение 48 ч после опыления. Однако экспрессия SIARF9 была также включена в неопыленные завязи, обработанные гормональным ауксином (фиг. 1с). До сих пор было установлено, что только генные экспрессии AtARF4, AtARF19 и *Oryza sativa* ARF23 являются индуцированными ауксином (Ulmasov et al., 1999, *supra*; Okushima et al., 2005, *supra*; Overvoorde et al., 2005, *supra*; Wang et al., 2007, *supra*). В данном исследовании мы анализировали 1500 п.о. 5' участок выше гена SIARF9 с PlantCARE (Lescot et al., 2002, *supra*) и PLACE (Higo et al., 1999, *supra*) программным обеспечением для присутствия связанных с ауксином цис-действующих элементов, что привело к определению двух вырожденных элементов ответа ауксина (AuxREs). Данные элементы обычно расположены в последовательностях промотора генов ауксинного ответа и связаны факторами транскрипции ARF (Ulmasov et al., 1999, *supra*). Более того, промоторная последовательность содержала несколько NTBBFIARROLB-элементов. Данные элементы были вначале определены в промоторной последовательности *golB*, один из онкогенов, присутствующих в последовательности Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes* и участвующих в индуцируемой ауксином экспрессии *golB* в растениях (Baumann et al., 1999, *The Plant Cell* 11, 323-333). Элементы как AuxRE, так и NTBBFIARROLB были также перепредставлены в промоторных последовательностях SIIAA2 и SIIAA14. Данные гены являются двумя членами семейства генов Aux/IAA томата, семейства транскрипционных репрессоров, которые регулируют экспрессией ауксин-отвечающих генов. Тем не менее, многие Aux/IAA сами индуцируются ауксином (Reed, 2001, *Trends in Plant Science* 6, 420-425). Экспрессия SIIAA2 и SIIAA14 была активирована после опыления (Vriezen et al., 2008, *supra*), а также в неопыленных завязях, обработанных ауксином, подобно SIARF9 (фиг. 1). Анализ промоторной последовательности AtARF9 привел к определению нескольких связанных с ауксином цис-действующих элементов (результаты не указаны). Присутствовали AuxRE, вырожденные AuxRE, а также NTBBFIARROLB-элементы. Кроме того, элемент ASF1MOTIFCAMV был перепредставлен. Данный элемент был обнаружен в нескольких чувствительных к ауксину генах, первоначально был обнаружен в промоторе CaMV 35S (Liu and Lam, 1994, *The Journal of Biological Chemistry* 269, 668-675). Подобные связанные с ауксином элементы присутствовали в промоторных последовательностях индуцированных ауксином AtIAA1 и AtIAA5 (Abel et al., 1995, *Journal of Molecular Biology* 251, 533-549).

Анализ промотора in silico показал, что 5'-конец верхних участков генов ARF9 имеет те же связанные с ауксином цис-действующие элементы, такие как найденные на участках промотора генов Aux/IAA, индуцируемых ауксином, предполагая, что экспрессия как SIARF9, так и AtARF9 регулируется ауксином. Более того, большая часть обнаруженных цис-элементов сходна в промоторных последовательностях томата и *Arabidopsis*.

2.2.2. Экспрессия индуцированных ауксином SIARF9 и AtARF9.

Так как подобные связанные с ауксином цис-действующие элементы были обнаружены в последовательностях промотора SIARF9 и AtARF9, можно ожидать, что способность ауксина к индуцированию промотора SIARF9 поддерживается *Arabidopsis*. Таким образом, 2200 п.о. 5'-конец фланкирующей последовательности SIARF9 кодирующей области был привязан перед β-глюкозунидазой (GUS), кодирующей последовательности гена *uidA*. Впоследствии, данный конструктор pSIARF9::uidA был введен в *Arabidopsis* с помощью *Agrobacterium*-опосредованной передачей генов. Созревшие розетки листьев полученных трансгенных линий были ложно обработаны или действительно обработаны 50 мкМ гетероауксином (IAA). После 3 и 9 ч инкубации образцы листа исследовались на экспрессию *uidA* с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Кроме того, данные образцы ткани использовались для изучения способности ауксина к индуцированию экспрессии AtARF9.

Несмотря на возможность определения экспрессии *uidA* для достоверного определения количества

уровни были слишком низкими. Напротив, определение количества транскриптных уровней AtARF9 представляется возможным. Транскриптные уровни AtARF9 возросли через 3 и 9 ч после обработки IAA. Тем не менее, экспрессия была также активирована в ложно обработанных образцах (данные не указаны). Таким образом, были изучены экспрессии AtI и AtIAA5. Транскриптные уровни данных генов были сильно индуцированы в IAA-обработанных образцах, в то время как транскриптные уровни остались низкими в ложно обработанных образцах (данные не указаны). Данные результаты показали, что экспериментальная организация была верной. Тот же эксперимент повторился на 10-дневных ростках линий pSIARF9::uidA, однако были получены подобные результаты. Результаты указывают на то, что предполагаемые элементы, связанные с ауксином, присутствовали в промоторной последовательности, экспрессия AtARF9 не индуцируется ауксином.

2.2.3. Наборы экспрессии SIARF9 и AtARF9 в Arabidopsis.

Так как экспрессия линий pSIARF9::uidA была слишком низкой для определения, возник вопрос, присутствуют ли регуляторные элементы в промоторной последовательности SIARF9 были функциональными в Arabidopsis. Следовательно, линии pSIARF9::uidA были исследованы после гистохимического окрашивания GUS. В 10-дневных ростках прилистники, молодые развивающиеся листья, трихомы развивающихся листьев, молодые зачатки боковых корней, а также кончики боковых корней были окрашены голубым. Более того, активность GUS была обнаружена в нескольких тканях в период морфогенеза. Самые молодые почки не проявили активность GUS, однако в более крупных почках экспрессия GUS наблюдалась в рыльце и на кончике чашелистика. После опыления активность GUS также наблюдалась в развивающихся семенах. Однако в стручках, собранных приблизительно спустя 6 дней после опыления (DAP), не было обнаружено активности GUS.

Для более детального исследования экспрессии AtARF9 были созданы трансгенные линии, с использованием 2466 п.о. 5'-конца фланкирующей последовательности AtARF9 кодирующей области, привязанной перед кодирующей последовательностью uidA, а также изучено после гистохимического окрашивания GUS. В 10-дневных ростках были окрашены прилистники и трихомы развивающихся листьев. Более того, окрашивание GUS могло быть обнаружено в центральном цилиндре корней. Во время цветочного морфогенеза GUS экспрессия не наблюдалась в самых молодых почках. В более крупных почках окрашивались только тычинки. Более подробное изучение показало, что данный окрашенный участок находился в развивающихся пыльцевых зернах, клетках тапетума и паренхимных клетках пыльников. В созревших почках, собранных прямо перед цветением, экспрессия GUS в тычинке была снижена, однако возросла в гинецее. После опыления экспрессия GUS гинецея стала более заметной и поддерживалась в развивающемся стручке. Кроме того, был окрашен отделительный слой стручка.

Данные результаты показали, что регуляторные элементы, присутствующие в промоторной последовательности SIARF9, были все еще функциональными в Arabidopsis. Тем не менее, промотор SIARF9 и промотор AtARF9 являются активными в разных тканях.

Пример 3. TILLING подход мутантов slarf9.

3.1. TILLING подход популяции томата.

Крайне гомозиготная инбредная линия, используемая в коммерческом обработанном разведении томата, была использована для мутагенеза следующим протоколом. После прорастания семян на влажной бумаге Ватмана® в течение 24 ч, ~ 20000 семян, разделенных на 8 партий по 2500, соответственно, были вымочены в 100 мл особо чистой воды и этилметансульфонате (EMS) в концентрации 1% в конических колбах. Колбы осторожно встряхивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Наконец, EMS промыли под проточной водой. После обработки EMS, семена непосредственно высевали в теплице. Из 60% семян, которые проросли, 10600 побегов были пересажены в поле. Из 8810 линий M1, которые дали плоды, были собраны два плода с растения. ДНК была выделена из семян из первого плода, составляющих популяцию M2 запаса ДНК. Они были самоопыленные, и семена M3 были выделены из плодов, и семена были использованы для ДНК выделения и образования популяции M3 банка ДНК.

3.2. Ген-мишень SIARF9 для ПЦР усиления популяции из Тиллинг подхода.

ДНК популяция томата TILLING подхода, описанная выше, прошла скрининг для одиночных нуклеотидных полиморфизмов в гене-мишени SIARF9. Для этой цели были разработаны следующие пары праймеров для амплификации консервативных частей N-терминального В3 суперсемейства ДНК-связывающего домена (DBD). Мутации на данном участке могут привести к замещению консервативных остатков, что ведет к снижению сходства мутантного белка SIARF9 для промоторных последовательностей генов-мишеней. В дополнение, потенциального терминирующего кодона в данный участок приведет к очень короткому укеченному белку SIARF9, который, вероятно, будет неактивным/нефункциональным.

Праймеры, созданные для скрининга мутировавшей популяции томата EMS для мутаций в SIARF9 ДНК-связывающий домен. F=прямой праймер; R=обратный праймер. AA нацеленные это остатки, закодированные продуктом амплификации.			
имя праймера	Последовательность праймеров 5'-3'- конец	экзон № нацеленные	AA нацеленные
F-4008	AATTTGAGAATTTTGGAGCTTTTT (SEQ ID NO: 15)	2	K20-Q56
R-4009	AGAACTTAGCCTTGAATCAACCA (SEQ ID NO: 16)	2	K20-Q56
F-4010	TGAGTTTCAGGTAACCAACACAG (SEQ ID NO: 17)	2	K20-Q56
R-4011	ACAGAAAAACAACAACACAG AA (SEQ ID NO: 18)	2	K20-Q56
F-4030	CCCCTGTTTTGACAAGTTGTTG (SEQ ID NO: 19)	6	D160- R187
R-4031	CATTGATATCTTCTGTTACACTCT AC (SEQ ID NO: 20)	6	D160- R187
F-4032	GTAGAGTGTAACAGAAGATATCA ATG (SEQ ID NO: 21)	7	G188- R218
R-4033	CCAGAGAGAGATACCTCAAGAAT AC (SEQ ID NO: 22)	7	G188- R218

Другие пары праймеров были разработаны для исследования, при необходимости, консервативных частей.

Пары праймеров были использованы для усиления мишени последовательности из M2 и M3 ДНК TILLING популяции и гетеродуплексов между мутантом и мишенью последовательности дикого вида, обнаруженной с помощью CSCE и HRM, как описано ниже. Идентификационный номер ДНК образцов связан с партиями семян растений, несущих аллель дикого вида или мутировавшего аллеля либо в гетерозиготной, либо в гомозиготной форме.

Семена проросли, и наличие конкретной мутации в отдельных растениях было подтверждено с помощью PCR, используя праймеры, фланкирующие мутировавший участок и геномную ДНК этих растений в качестве шаблонов. ДНК секвенирование фрагментов определило гомозиготные и гетерозиготные мутанты для ожидаемой мутации. Гомозиготные мутанты были выбраны или получены после самоопыления и последующей селекции, и влияние мутации на соответствующие белки и фенотип растения.

Следующие мутанты были определены с помощью пары праймеров SEQ ID NO: 19 и 22 (мутант 1719, мутант 2484, мутант 6725 и мутант 6932) или пара праймеров SEQ ID NO: 15 и 16 (мутант 3175) и семена получили номера доступа NCIMB, указанные ниже.

Растение мутантного томата	Номер доступа NCIMB	Мутация в ARF9 геномной ДНК (SEQ ID NO: 3)	Мутация в белке ARF9 (SEQ ID NO: 2 или 3)
Мутант 1719	NCIMB 41827	Нуклеотид 3529 меняется с с на а: cag → aag	В интроне между экзонами 6 и 7, рядом с нуклеотидами ag, необходимо для правильного сращивание пре-мРНК
Мутант 2484	NCIMB 41828	нуклеотид 3540 меняется с с на t: cgg → tgg	аминокислота 191 в экзоне 7 меняется с Arg на Trp
Мутант 3175	NCIMB 41829	Нуклеотид 2254 меняется с g на a: ggc → agc	аминокислота 52 в экзоне 2 меняется с His на Tyr
Мутант 6725	NCIMB 41830	Нуклеотид 3546 меняется с с на t: cat → tat	аминокислота 193 в экзоне 7 меняется с His на Tyr
Мутант 6932	NCIMB 41831	Нуклеотид 3546 меняется с с на t: cat → tat	аминокислота 193 в экзоне 7 меняется с His на Tyr

Таким образом, один мутант *slarf9* может повлиять на сплайсинг пре-мРНК (мутант 1719), один мутант находится в экзоне 2 (мутант 3175) и три мутанта в экзоне 7 (мутанты 2484, 6725 и 6932), который является частью b3-полученного ДНК-связывающего домена *SlARF9*.

Растения, включающие мутации в целевой последовательности, такие как вышеуказанные мутантные растения или растения, полученные из них (например, путем самоопыления или скрещивания) и включающие мутантный аллель *slarf9*, проходили фенотипный скрининг для развития значительно более крупных плодов.

Два мутантных аллеля могут также сочетаться в одном растении путем скрещивания растений с разными мутациями для определения влияния на размер плода.

3.3. Конформация чувствительного капиллярного электрофореза (КЧКЭ).

Мультиплекс PCR реакции проводятся в 10 мкл объеме с 0,15 нг, 4-кратной сгруппированной геномной ДНК. Маркированные праймеры были добавлены в PCR подготовленную смесь к концентрации в 5 раз ниже (1 мкм), чем у немаркированных праймеров. Пост PCR образцы были разбавлены 10 раз.

До выполнения КЧКЭ 2 мкл разбавленных продуктов добавили к 38 мкл MQ воды. Образцы вводятся в 50 см капилляры (время инъекции и напряжения: 16 с, 10 кВ; запуск напряжения: 15 кВ) из аппарата ABI 3130x1, заполненного полу-денатурирующими полимерами в следующем составе: 5 г конформационного аналитического полимера (CAP) (Applied Biosystems, 434037, 9%), 2,16 г Ureum, 0,45 г 20xTTE (национальная диагностика, EC-871), дополненных водой MQ до 9 г. Текущий буфер подготовлен с 1x разбавленной TTE и 10% глицерином. Температура в печи установлена на 18°C).

Исходные данные анализируются с гетеродуплексным анализом (HDA) с программным обеспечением BioNumerics, программа отличает пиковые формы гетеро-дуплексных (мутантн) и гомодуплексных молекул (дикого вида), обеспечивая тем самым возможность выбора ДНК-групп, содержащих отдельные линии, мутировавшие в ген-мишень.

3.4. Анализ высокого разрешения кривых плавления (HRM).

LCgreen PCRs выполняется на 8 плотно прилегающих группах в FramStar 96 колодцах пластинок

(4titude, Великобритания). 2 мкл (15 нг) сгруппированных ДНК смешиваются с 2 мкл F-524 Phire™ 5× буфером реакции (FINNZYMES, Финляндия), 0.1 мкл Phire™ Hot Start ДНК-полимеразой (FINNZYMES, Финляндия), 1 мкл LCGreen™ Plus+ (BioChem, США), 0.25 мкл 5 мм праймерами, и дополнены 10 мкл с MQ водой) согласно рекомендациям производителя. Группы, содержащие мутации, проходят скрининг с помощью LightScanner® System (Idaho Technology Inc, США). Положительные группы выбираются на основе анализа профилей температуры плавления, когда группа содержит мутации, она покажет более низкую температуру плавления.

Пример 4. Перенос мутантного аллеля *slarf9* в сорта томата.

Мутанты TILLING подхода, содержащие мутантный аллель *slarf9*, такие как любой из вышеперечисленных мутантных аллелей, пересекаются с различными линиями томатов для переноса мутантного аллеля в эти линии, генерируя томаты с хорошими агрономическими характеристиками и значительно более крупными плодами.

TaqMan® SNP маркер анализа генотипирования (Applied Biosystems) разработан для определения наличия модифицированного нуклеотида. Этот анализ используется для маркерно-вспомогательной приоритетной селекции, который эффективен для переноса рецессивных генов в необходимую среду, например коммерческих родительских линий томата, так как их классический перенос требует дополнительных периодически повторяющихся поколений самоопыления (Ribaut et al. Plant Molecular Biology Reporter 15:154-162).

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Нунхемс В.Ф.
 <120> Растения с увеличенным размером плода
 <130> BCS10-2006 PCT
 <150> EP10005603.5
 <151> 2010-05-28
 <160> 32
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1977
 <212> ДНК
 <213> не известно
 <220>
 <223> *Solanum lycopersicum* ARF9 кодирующая последовательность из cv Moneymaker
 <400> 1
 atggcaacta taaatgggtg gtgttatgag tctcagccga atatgaattc tccaggtaaa 60
 aaagatgctc tgtatcatga gctatggcag ttgtgtgcag gtccagtagt tgatgttccc 120
 agggaaggag aaagagttta ttattttcct caaggccaca tggaacaatt ggtagcatca 180
 attaatcaag aaatggatca aagagttcca tcattcaatc tcaaatcaaa ggtcctttgt 240
 cgagttatca atagtcattt cctggctgaa gaagacaatg atgaggctca tgtccagatc 300
 actttgatgc cagaggcacc acatgtaccg gagccgacta ctccggatcc attaattccg 360
 caggatgtaa agcctagatt ccattctttc tgcaagggtcc tgacagcctc cgatacaagc 420
 actcatgggtg gattttctgt tctaaggaaa catgctaata aatgccttcc tccattggac 480
 ttgaaccagc agactccgac ccaggaattg attgcgaaag accttcatga cgtggagtgg 540

030460

cgcttcaagc atatatttag aggccaacct cggagacatt tacttaccac aggggtggagt 600
 acctttgttt cttcaaagaa attagtgcca ggggattcct ttgtattcct gaggggtaat 660
 aatggacagc tgcgagttgg ggtcaaaagg cttgttcgcc agcagagctc aatgccgtca 720
 tcggtgatgt caagccagag catgcacctt ggagtcttgg ctacagcatc tcatgctggt 780
 acaaccaga caatgtttgt tgtttactac aaaccgagaa cactcagtt catcgtaggc 840
 gtcaacaaat acttagaggc tcttaaacad gaatatgcag ttggcatgcg attcaaaatg 900
 cagtttgaag ccgaagggaa tcctgataga agatttatgg gcactatagt tggaaattgat 960
 gatctttcct cacagtggaa aaattctgcg tggcgatcct tgaaggccg atgggacgag 1020
 cctgcagcca ttgcaaggcc tgacagagtt tctccttggg aaattaaacc ttatgtgtgt 1080
 tcaattcaa atgtccttgt cccaccaacc gcagagaaga acaaaaggca tcggctacat 1140
 agtgaaatca aaatatcaga acaaccttca tctcaaatg ctccggcggg ttggaatcct 1200
 tcccttcgat cgcctcagtt taacacctt ggcatcaaca gcagtactaa ttgcgcatta 1260
 gcgtctctta cagagagtgg ttggcagctt cctcatttaa atacttcagg tatgcttggt 1320
 gatgagccag aagacggtag gagtgtcca acttgggtgtg gttttccatg cgttttggcc 1380
 ccgcagttcg gtcaagggac taatcagccg attgttattc ctactgatgg gagaaaatgt 1440
 gatacaaaaa aaacctgtag attatttggg attgacttga aaagttcctc aattagcact 1500
 actgaggcac gactacagct acagccagcc ggcatttctt gtgtctttgc agagagagca 1560
 cctcaaaca cggcgcctgc tgggtgattca gatcaaaagt ctgagctttc agtagacttc 1620
 aaagatcaaa tgcaaggcca tttgcgggta cccctaaagg aggttcaaag caagcagagt 1680
 tgttccacca ggtctcgcac aaaggtgcaa atgcaaggcg tagctgtagg tcgtgcagtg 1740
 gatttaacca tattgaaagg atacgatgag cttacaaagg agcttgagga gatgtttgaa 1800
 atccaaggag agcttcagtc acgacagaaa tgggggatct tgtttacaga tgatgaaggg 1860
 gatacaatgc ttatgggtga ttatccgtgg caagactttt gcaatgtggt gaggaagatt 1920
 ttcatttggt caagtcagga tatgaaaaaa ttgacctgt ctcgcgcaga ccattaa 1977

<210> 2
 <211> 658
 <212> PRT
 <213> не известно

<220>
 <223> Solanum lycopersicum ARF9 белок из cv Moneymaker

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (74)..(236)
 <223> полученный из В3 ДНК-связывающий домен

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (237)..(564)
 <223> Средний участок (MR)

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (256)..(332)
 <223> участок характеристики ауксина, часть среднего участка (MR)

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (565)..(602)
 <223> Домен димеризации III

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (609)..(651)
 <223> Домен димеризации IV

<400> 2

Met Ala Thr Ile Asn Gly Trp Cys Tyr Glu Ser Gln Pro Asn Met Asn
 1 5 10 15

Ser Pro Gly Lys Lys Asp Ala Leu Tyr His Glu Leu Trp Gln Leu Cys
 20 25 30

Ala Gly Pro Val Val Asp Val Pro Arg Glu Gly Glu Arg Val Tyr Tyr
 35 40 45

Phe Pro Gln Gly His Met Glu Gln Leu Val Ala Ser Ile Asn Gln Glu
 50 55 60

Met Asp Gln Arg Val Pro Ser Phe Asn Leu Lys Ser Lys Val Leu Cys
 65 70 75 80

Arg Val Ile Asn Ser His Phe Leu Ala Glu Glu Asp Asn Asp Glu Val
 85 90 95

Tyr Val Gln Ile Thr Leu Met Pro Glu Ala Pro His Val Pro Glu Pro
 100 105 110

Thr Thr Pro Asp Pro Leu Ile Pro Gln Asp Val Lys Pro Arg Phe His
 115 120 125

Ser Phe Cys Lys Val Leu Thr Ala Ser Asp Thr Ser Thr His Gly Gly
 130 135 140

Phe Ser Val Leu Arg Lys His Ala Asn Glu Cys Leu Pro Pro Leu Asp
 145 150 155 160

Leu Asn Gln Gln Thr Pro Thr Gln Glu Leu Ile Ala Lys Asp Leu His

030460

Asn Cys Ala Leu Ala Ser Leu Thr Glu Ser Gly Trp Gln Leu Pro His
 420 425 430

Leu Asn Thr Ser Gly Met Leu Val Asp Glu Pro Glu Asp Gly Arg Ser
 435 440 445

Ala Pro Thr Trp Cys Gly Phe Pro Cys Val Leu Ala Pro Gln Phe Gly
 450 455 460

Gln Gly Thr Asn Gln Pro Ile Val Ile Pro Thr Asp Gly Arg Lys Cys
 465 470 475 480

Asp Thr Lys Lys Thr Cys Arg Leu Phe Gly Ile Asp Leu Lys Ser Ser
 485 490 495

Ser Ile Ser Thr Thr Glu Ala Arg Leu Gln Leu Gln Pro Ala Gly Ile
 500 505 510

Ser Cys Val Phe Ala Glu Arg Ala Pro Pro Asn Thr Val Pro Ala Gly
 515 520 525

Asp Ser Asp Gln Lys Ser Glu Leu Ser Val Asp Phe Lys Asp Gln Met
 530 535 540

Gln Gly His Leu Arg Leu Pro Leu Lys Glu Val Gln Ser Lys Gln Ser
 545 550 555 560

Cys Ser Thr Arg Ser Arg Thr Lys Val Gln Met Gln Gly Val Ala Val
 565 570 575

Gly Arg Ala Val Asp Leu Thr Ile Leu Lys Gly Tyr Asp Glu Leu Thr
 580 585 590

Lys Glu Leu Glu Glu Met Phe Glu Ile Gln Gly Glu Leu Gln Ser Arg
 595 600 605

Gln Lys Trp Gly Ile Leu Phe Thr Asp Asp Glu Gly Asp Thr Met Leu
 610 615 620

Met Gly Asp Tyr Pro Trp Gln Asp Phe Cys Asn Val Val Arg Lys Ile
 625 630 635 640

Phe Ile Cys Ser Ser Gln Asp Met Lys Lys Leu Thr Leu Ser Arg Ala
 645 650 655

Asp His

<210> 3
<211> 7510
<212> ДНК
<213> не известно

<220>
<223> ARF9 промотор и ген из *Solanum lycopersicum* cv Moneymaker

<220>
<221> Промотор
<222> (1)..(2004)
<223> ARF9 промотор

<220>
<221> misc_feature
<222> (612)..(617)
<223> AuxRE элемент

<220>
<221> misc_feature
<222> (888)..(893)
<223> NTBBF1ARROLB элемент

<220>
<221> misc_feature
<222> (1224)..(1229)
<223> AuxRE элемент

<220>
<221> misc_feature
<222> (1541)..(1546)
<223> NTBBF1ARROLB элемент

<220>
<221> misc_feature
<222> (1824)..(1829)
<223> NTBBF1ARROLB элемент

<220>
<221> misc_feature
<222> (1831)..(1836)
<223> NTBBF1ARROLB элемент

<220>
<221> экзон
<222> (2005)..(2059)
<223> Экзон 1 из ATG иницирующего трансляцию кодона

<220>
<221> экзон
<222> (2156)..(2268)
<223> Экзон 2

<220>
<221> экзон
<222> (2495)..(2590)
<223> Экзон 3

<220>
<221> экзон
<222> (2949)..(3008)

<223> Экзон 4

<220>

<221> Экзон

<222> (3095)..(3247)

<223> Экзон 5

<220>

<221> Экзон

<222> (3347)..(3431)

<223> Экзон 6

<220>

<221> Экзон

<222> (3532)..(3622)

<223> Экзон 7

<220>

<221> Экзон

<222> (3765)..(3929)

<223> Экзон 8

<220>

<221> Экзон

<222> (4054)..(4167)

<223> Экзон 9

<220>

<221> Экзон

<222> (4433)..(4505)

<223> Экзон 10

<220>

<221> Экзон

<222> (4581)..(4734)

<223> Экзон 11

<220>

<221> Экзон

<222> (4843)..(5387)

<223> Экзон 12

<220>

<221> Экзон

<222> (5495)..(5682)

<223> Экзон 13

<220>

<221> Экзон

<222> (5795)..(5879)

<223> Экзон 14 до терминирующего трансляцию кодона

<400> 3

acagagtcac tcgtaatgta aatTTTTtca tatctaatat ttaatttaat gttctcgatt 60

tagagtaaag aattctcaac atgataatta gtactTTTTa atTTTcgcac gctTTTactt 120

TTTaatatga tagcggagtc acttatgacg taaatttctc cacatctaag actacaaatc 180

taatgtcttc gattgagact taagaattct caccgttaca tattaaatta taatcttgac 240

TTTTatgcaa TTTTtacggt agttattcca ccattacacg acagcgggtg ttaactttac 300

030460

agtttaattt gagaattttg gagctttttt tgtttttttt gtttaaaatg tggatttttt 2139
 attttttgag tttcag gt aaa aaa gat gct ctg tat cat gag cta tgg cag 2190
 Gly Lys Lys Asp Ala Leu Tyr His Glu Leu Trp Gln
 20 25 30
 ttg tgt gca ggt cca gta gtt gat gtt ccc agg gaa gga gaa aga gtt 2238
 Leu Cys Ala Gly Pro Val Val Asp Val Pro Arg Glu Gly Glu Arg Val
 35 40 45
 tat tat ttt cct caa ggc cac atg gaa caa gtaaaaaatt ttattttaaa 2288
 Tyr Tyr Phe Pro Gln Gly His Met Glu Gln
 50 55
 aaaataattg aattctgtgt ttttttttct ttctgtttta ggtgaatctg gttgattcaa 2348
 ggctaagttc ttgtttttga gttatggagt tgtgaatttt tattgaattt ctcaatttga 2408
 gtgtatattt ttagttatgt tttctgggga ttgtaaaatc tgtatctttc tctttttgtc 2468
 tcactttttt tggttttgtg gaaaag ttg gta gca tca att aat caa gaa atg 2521
 Leu Val Ala Ser Ile Asn Gln Glu Met
 60 65
 gat caa aga gtt cca tca ttc aat ctc aaa tca aag gtc ctt tgt cga 2569
 Asp Gln Arg Val Pro Ser Phe Asn Leu Lys Ser Lys Val Leu Cys Arg
 70 75 80
 gtt atc aat agt cat ttc ctg gtatgtttat atttcatggg gttatttgat 2620
 Val Ile Asn Ser His Phe Leu
 85
 cagtttattt tacatacatt gtattcatac ttgttagtaa ttcacccaaa aaaagtgatg 2680
 aatttattgt tgggttcaaa attcaaacat cggaagggtga gccttggcgt attcgtagct 2740
 ggcaaagttg tcggtttgtc gccaaagtga cgaccatgag gtcaccggtc aatgcgtgta 2800
 agcaatctct tgcagaaatg cagggtaagg ttgtgtccaa cagaccctta tagtccagtc 2860
 tagcggggagc tttagtgcac ctgaatgcgt gtaaagttca tacaattttg tatttgaaat 2920
 gtaaaatggt tttgatgatt gcttgtag gct gaa gaa gac aat gat gag gtc 2972
 Ala Glu Glu Asp Asn Asp Glu Val
 90 95
 tat gtc cag atc act ttg atg cca gag gca cca cat gtaagaagtt 3018
 Tyr Val Gln Ile Thr Leu Met Pro Glu Ala Pro His
 100 105
 aaaattggtg tagtattcac ttgtttatat gcattttatt gatcaatttg gttttaatta 3078
 ttgatctgat ttttag gta ccc gag ccg act act ccg gat cca tta att ccg 3130
 Val Pro Glu Pro Thr Thr Pro Asp Pro Leu Ile Pro
 110 115 120
 cag gat gta aag cct aga ttc cat tct ttc tgc aag gtc ctg aca gcc 3178
 Gln Asp Val Lys Pro Arg Phe His Ser Phe Cys Lys Val Leu Thr Ala
 125 130 135
 tcc gat aca agc act cat ggt gga ttt tct gtt cta agg aaa cat gct 3226
 Ser Asp Thr Ser Thr His Gly Gly Phe Ser Val Leu Arg Lys His Ala

030460

140	145	150	
aat gaa tgc ctt cct cca ttg gtaatataag tgtgatcatt ttgtataggc			3277
Asn Glu Cys Leu Pro Pro Leu			
155			
tagactacgt ttccccccct gttttgacaa gttgttgaat tagctgtcgt gtttgttata			3337
ctttgttag gac ttg aac cag cag act ccg acc cag gaa ttg att gcg aaa			3388
Asp Leu Asn Gln Gln Thr Pro Thr Gln Glu Leu Ile Ala Lys			
160	165	170	
gac ctt cat gac gtg gag tgg cgc ttc aag cat ata ttt aga g			3431
Asp Leu His Asp Val Glu Trp Arg Phe Lys His Ile Phe Arg			
175	180	185	
gtaattgttt tgttttaga gtgtaacaga agatatcaat gaagctttat catgtattgt			3491
aaagggtcaaa agtcatccgt ctttgtttta attataacag gc caa cct cgg aga			3545
		Gly Gln Pro Arg Arg	
		190	
cat tta ctt acc aca ggg tgg agt acc ttt gtt tct tca aag aaa tta			3593
His Leu Leu Thr Thr Gly Trp Ser Thr Phe Val Ser Ser Lys Lys Leu			
195	200	205	
gtg gca ggg gat tct ttt gta ttc ttg ag gtatctctct ctggctctag			3642
Val Ala Gly Asp Ser Phe Val Phe Leu Arg			
210	215		
cttctcgtat gagtatgata tttgattgca ttgtctatca ctattgcatg tcatgtcata			3702
tatccagaac agttaatggt ggtttgtaa taatcatatt ctaatggata tgtacgctct			3762
ag g ggt aat aat gga cag ctg cga gtt ggg gtc aaa agg ctt gtt cgc			3810
Gly Asn Asn Gly Gln Leu Arg Val Gly Val Lys Arg Leu Val Arg			
220	225	230	
cag cag agc tca atg ccg tca tcg gtg atg tca agc cag agc atg cac			3858
Gln Gln Ser Ser Met Pro Ser Ser Val Met Ser Ser Gln Ser Met His			
235	240	245	
cta gga gtc ttg gct aca gca tct cat gct gtt aca acc cag aca atg			3906
Leu Gly Val Leu Ala Thr Ala Ser His Ala Val Thr Thr Gln Thr Met			
250	255	260	265
ttt gtt gtt tac tac aaa ccg ag gtttgcaca tacacctcct ttcaattatc			3959
Phe Val Val Tyr Tyr Lys Pro Arg			
270			
ccgtcatcct tacgcagtag agatcatttt catgccagag aacatactaa atctttcata			4019
tgctcttcca attttctgct ttgacaacct tcag a acc act cag ttc atc gta			4072
		Thr Thr Gln Phe Ile Val	
		275	
ggc gtc aac aaa tac tta gag gct ctt aaa cat gaa tat gca gtt ggc			4120
Gly Val Asn Lys Tyr Leu Glu Ala Leu Lys His Glu Tyr Ala Val Gly			
280	285	290	295
atg cga ttc aaa atg cag ttt gaa gcc gaa ggg aat cct gat aga ag			4167
Met Arg Phe Lys Met Gln Phe Glu Ala Glu Gly Asn Pro Asp Arg Arg			
300	305	310	

030460

480	485	490	
aaa agt tcc tca att agc act act gag gca cga cta cag cta cag cca			5210
Lys Ser Ser Ser Ile Ser Thr Thr Glu Ala Arg Leu Gln Leu Gln Pro			
495	500	505	
gcc ggc att tct tgt gtc ttt gca gag aga gca cct cca aac acg gtg			5258
Ala Gly Ile Ser Cys Val Phe Ala Glu Arg Ala Pro Pro Asn Thr Val			
510	515	520	525
cct gct ggt gat tca gat caa aag tct gag ctt tca gta gac ttc aaa			5306
Pro Ala Gly Asp Ser Asp Gln Lys Ser Glu Leu Ser Val Asp Phe Lys			
	530	535	540
gat caa atg caa ggc cat ttg cgg tta ccc cta aag gag gtt caa agc			5354
Asp Gln Met Gln Gly His Leu Arg Leu Pro Leu Lys Glu Val Gln Ser			
	545	550	555
aag cag agt tgt tcc acc agg tct cgc aca aag gtattaaatc aaaagccaaa			5407
Lys Gln Ser Cys Ser Thr Arg Ser Arg Thr Lys			
	560	565	
aaattgcatt cttaccaact cattttcggcc acaaaacata ttattaaact ctctaacatc			5467
ttttcacatg tggaatccct tgagaag gtg caa atg caa ggc gta gct gta ggt			5521
	Val Gln Met Gln Gly Val Ala Val Gly		
	570	575	
cgt gca gtg gat tta acc ata ttg aaa gga tac gat gag ctt aca aag			5569
Arg Ala Val Asp Leu Thr Ile Leu Lys Gly Tyr Asp Glu Leu Thr Lys			
	580	585	590
gag ctt gag gag atg ttt gaa atc caa gga gag ctt cag tca cga cag			5617
Glu Leu Glu Glu Met Phe Glu Ile Gln Gly Glu Leu Gln Ser Arg Gln			
	595	600	605
aaa tgg ggg atc ttg ttt aca gat gat gaa ggg gat aca atg ctt atg			5665
Lys Trp Gly Ile Leu Phe Thr Asp Asp Glu Gly Asp Thr Met Leu Met			
	610	615	620
ggg gat tat ccg tgg ca gtaagttctc tctcacttaa aaaaatttaa			5712
Gly Asp Tyr Pro Trp Gln			
	630		
gactgaatac atatacaacc actgcataag atcttttcta caacctgtaa tttaacacat			5772
cacttaaadc acttaattgc ag a gac ttt tgc aat gtg gtg agg aag att			5822
	Asp Phe Cys Asn Val Val Arg Lys Ile		
	635	640	
ttc att tgt tca agt cag gat atg aaa aaa ttg acc ctg tct cgc gca			5870
Phe Ile Cys Ser Ser Gln Asp Met Lys Lys Leu Thr Leu Ser Arg Ala			
	645	650	655
gac cat taa gcagctcctt tcaaatgaaa tgatggcgga agatggtgaa			5919
Asp His			
agttaaagac tccgcctttt gaagtggtag cgttttgtga tctctttggc ttcattctct			5979
atatatagta ggaaagaacg acaggttggt gacatagcaa ggcgtagaag cttgttttta			6039
cgctcttttt agcctagtgc agctccgttt tgagagcagt taagtaagta actagttata			6099

ataggataag actagtaaaa atatagtact agaagtagta aaaagttaag ggtgttctct 6159
aatggggagt ctatatagta gtagtttatg tagttttcta ttcgcgcggtt aacctgtaaa 6219
tactcatgtg ccattgtagt attctggaaa tactacaatg tatgggtcttg ttaacgtgct 6279
ttatgcctta tcttatatga aaactccatg gtggagattg ctctgtactt gctctttctg 6339
tatgactttt gtgatgcaca atagggattt cttgtctaaa tttagactct tttggcacia 6399
tcatgcatca ctttgtaact ttccccttta ctgaacaaaa aaatctttca aaacgctcct 6459
tcgcggtgtgt gtttgtttta ttctttgcta aagggtgatc ctaacattta aattagatac 6519
cgttttcttt actataaggg tgacttgaac tcaaaacctg ttttattagt atgttactct 6579
attdagaagt ttaataattd attagatatg acatttctat ttaccttgct attdcttdta 6639
acaatattta ctttagatt tatataagtt tttgattcat taactgactt tggttaagat 6699
gttgagtgca aaataaatag atggttcatc ttttgagcta gcgtagagtc attdtccttd 6759
aaacttdata aagcacttac aatcacatat ttgtgcattc ttagtgcacg ttdgacctg 6819
gataattdtc actattdtat ggaactgtat attataattd ttdtggatt agaagaactc 6879
aaaaagactc ttdtcataat ttdattccga atcactcgta caaaaatcaa aaaacaattd 6939
caagttgtat tcatttdcaa gcaaaagttc aatttgtcac tatcacttgt aacacaaaata 6999
ttdtcccttd cgaattdcac aattdtaata ttctaagttc ctdtdtgaga acttdtagtg 7059
aaaggaaaat tgggcttdtg gaattgttdg gtcttcaata tcctatcct agctaggaag 7119
agtgtccata tagtcatggg cctcatgagt tgtcaaatgt tacgtaaagg tatttatctt 7179
tgcatgagtg ttdggtcacg ctcaaaactt ctdtdattata agtctgagtc ttdgtgttat 7239
gtatccatgc ttdgcttgca tgatgttdtg gtcattdcta atcttdattga atggactata 7299
aaggacttag tcaagtataa ctataaaatg acgatagctt atagacaact tcgtagttgt 7359
tggagtatac aacacgctga catcgacttc ttdggatttd gtaatcataa ttdtdtdtdaa 7419
aaaaacaaa tctcctcaat caacttdctg attdtagtag taatccatcg attdcaggtac 7479
attdcatgacg tgatgtgttc gattaatatt t 7510

<210> 4
<211> 7500
<212> ДНК
<213> не известно

<220>
<223> ARF9 промотор и ген из Solanum lycopersicum cv Heinz 1706

<220>
<221> Промотор
<222> (1) .. (1995)

<220>
<221> misc_feature
<222> (612)..(617)
<223> AuxRE

<220>
<221> misc_feature
<222> (888)..(893)
<223> NTBBF1ARROLB элемент

<220>
<221> misc_feature
<222> (1229)..(1234)
<223> AuxRE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1815)..(1820)
<223> NTBBF1ARROLB элемент

<220>
<221> misc_feature
<222> (1822)..(1827)
<223> NTBBF1ARROLB элемент

<220>
<221> экзон
<222> (1996)..(2050)
<223> экзон 1

<220>
<221> экзон
<222> (2146)..(2258)
<223> экзон 2

<220>
<221> экзон
<222> (2485)..(2580)
<223> экзон 3

<220>
<221> экзон
<222> (2939)..(2998)
<223> экзон 4

<220>
<221> экзон
<222> (3085)..(3237)
<223> экзон 5

<220>
<221> экзон
<222> (3337)..(3421)
<223> экзон 6

<220>
<221> экзон
<222> (3522)..(3612)
<223> экзон 7

<220>
<221> экзон
<222> (3755)..(3919)

<223> ЭКЗОН 8

<220>

<221> ЭКЗОН

<222> (4044)..(4157)

<223> ЭКЗОН 9

<220>

<221> ЭКЗОН

<222> (4423)..(4495)

<223> ЭКЗОН 10

<220>

<221> ЭКЗОН

<222> (4571)..(4724)

<223> ЭКЗОН 11

<220>

<221> ЭКЗОН

<222> (4833)..(5377)

<223> ЭКЗОН 12

<220>

<221> ЭКЗОН

<222> (5485)..(5672)

<223> ЭКЗОН 13

<220>

<221> ЭКЗОН

<222> (5785)..(5869)

<223> ЭКЗОН 14 до терминирующего трансляцию кодона

<400> 4

```

acagagtcac tcgtaatgta aatTTTTTca tatctaatat ttaatttaat gttctcgatt      60
tagagtaaag aattctcaac atgataatta gtactTTTTa attttcgcac gcttttactt      120
tttaatatga tagcggagtc acttatgacg taaatttctc cacatctaag actacaaatc      180
taatgtcttc gattaagact taagaattct caccgttaca tattaaatta taatcttgac      240
ttttatgcaa tttttacggg agttattcca ccattacacg acaggcggtg ttaactttac      300
ttagttaata accagcccgt tacttaccca accaacgccc cacacactta aatccaaggt      360
ccccaatata gactacagaa attttgccgt tacataataa ttaattctct tgactttcac      420
actTTTTTtac ttcttaataa tataacagag tcacccgtaa cgtaaatttt tccatatcta      480
agatttaaat ctaatgtcct cgattaagag caaaaaactc ccaccattac atgataatta      540
gtactTTTTg actttcgcac gctttcactt tttaatacaa taacgggatc actcctaagt      600
cgtaacataa atgtcaccgc atctaacact taaatctaata atcctctatt aagactaaag      660
aatccaacc attacatgat aattagtagt tctcgagttt cgcacgcttt tacttcttaa      720
cataataact gagtcatttg taacgtaaata ttctccacat ctaaaaactca catccaatat      780
ctttgattaa gacttaagaa ttctcaccgt tacataataa ttaataatct tgacttttat      840
gcaatTTTTa cggtagttgt tccaccattg cttgacaggt ggtgttaact ttacttagtt      900

```

aataaccacc cgttacttac ccaaccaacc ccccccccc ccccgcacac aacttaaat 960
ccaaggtccc cgattaaaga ctaaagaaat ctgcgcgta cataataatt aatactcttg 1020
actttcacac ctttttactt ctttaatacaa taacactcgt aacgtaaatt tttccatatac 1080
taagatttaa atctaagtgc ctgattaag agtaaaatct cttaccatta catgataatt 1140
agtacttttt gacttttcgca cgcttttact ttttaataca ataacgggggt cactttcaat 1200
tagtcgtaac gtaaatatca ccgcatctaa gacataaatc caatgtactc gattaagact 1260
aaaaaaatcc aaccattaca tgataattaa cacttctgga ctttcgcacg cttttacttc 1320
ttaacacaat aatggagtca cttgtaacat aaattttctc acctttaaca ctcaaatac 1380
ctatctccga ttaggactaa aacaaaactc acggttacat actaattaat atgtttgact 1440
tttacacaat ttttacagta gttattccgc caatacacga aagcgggtgtt aactctactt 1500
ctaaccaagc ttataaaacc caaccaaccc cccactctac ttcacactac acagatgaaa 1560
aaaggagaga aacacgttct ctgcagggag cggtagaaag caacaaatca agccatatac 1620
taagctgttt ttgggtaaac tccgttacag agttttctct ttctctctct cactttctct 1680
ctttctctca cataaaaat agaaagaaaa aaaaaatgaa attattaagc tgttgcttct 1740
tctgttggtg ctctgtttg ttccagtaga actagtacta ctattgtag ttaatttttt 1800
ttatattcag cactacttta aactttatth ttagtgttg ggggtgtttc ttaaggctt 1860
ttttatgtgt tgttgttata gcagggaga aatgtggtga attttagcta gttttgtgat 1920
gtttttttga gctaattact tgattttgaa ttctgggtgt tcttttagttt ttggaattga 1980
aggttgatta tactc atg gca act ata aat ggg tgg tgt tat gag tct cag 2031
Met Ala Thr Ile Asn Gly Trp Cys Tyr Glu Ser Gln
1 5 10
ccg aat atg aat tct cca g gtgaaagttt gattttttga agtttaattt 2080
Pro Asn Met Asn Ser Pro
15
gagaattttg gagctttttt tgtttttttg tttaaaatgt ggatttttta ttttttgagt 2140
ttcag gt aaa aaa gat gct ctg tat cat gag cta tgg cag ttg tgt gca 2189
Gly Lys Lys Asp Ala Leu Tyr His Glu Leu Trp Gln Leu Cys Ala
20 25 30
ggg cca gta gtt gat gtt ccc agg gaa gga gaa aga gtt tat tat ttt 2237
Gly Pro Val Val Asp Val Pro Arg Glu Gly Glu Arg Val Tyr Tyr Phe
35 40 45
cct caa ggc cac atg gaa caa gtaaaaaatt ttatttttaa aaaataattg 2288
Pro Gln Gly His Met Glu Gln
50 55
aattctgtgt tgttgttttt ttctgtttta ggtgaatctg gttgattcaa ggctaagttc 2348
ttgtttttga gttatggagt tgtgaatttt tattgaattt ctcaatttga gtgtatattt 2408
ttagttatgt tttctgggga ttgtaaaatc tgtatcttcc tctttttgtc tcaactttttt 2468

030460

tggttttgtg gaaaag ttg gta gca tca att aat caa gaa atg gat caa aga 2520
 Leu Val Ala Ser Ile Asn Gln Glu Met Asp Gln Arg
 60 65

gtt cca tca ttc aat ctc aaa tca aag gtc ctt tgt cga gtt atc aat 2568
 Val Pro Ser Phe Asn Leu Lys Ser Lys Val Leu Cys Arg Val Ile Asn
 70 75 80

agt cat ttc ctg gtatgtttat atttcattgt gttatttgat cagtttattt 2620
 Ser His Phe Leu
 85

tacatacatt gtattcatac ttgttagtaa ttcattccaaa aaaagtgatg aatttattgt 2680

tgggttcaaaa attcaaacat cggaaggtga gccttggcgt attcgtagct ggcaaagttg 2740

tcggtttgtc gccaaagtga cgaccatgag gtcaccgttc aatgcgtgta agcaatctct 2800

tgcagaaatg cagggtaagg ttgtgtccaa cagaccctta tagtccagtc tagcggggagc 2860

tttagtgcac ctgaatgcgt gtaaagttca tacaattttg tatttgaaat gtaaaatggt 2920

tttgatgatt gctttagtag gct gaa gaa gac aat gat gag gtc tat gtc cag 2971
 Ala Glu Glu Asp Asn Asp Glu Val Tyr Val Gln
 90 95

atc act ttg atg cca gag gca cca cat gtaagaagtt aaaattggtg 3018
 Ile Thr Leu Met Pro Glu Ala Pro His
 100 105

tagtattcac ttgtttatat gcattttatt gatcaatttg gttttaatta ttgatctgat 3078

ttttag gta ccc gag ccg act act ccg gat cca tta att ccg cag gat 3126
 Val Pro Glu Pro Thr Thr Pro Asp Pro Leu Ile Pro Gln Asp
 110 115 120

gta aag cct aga ttc cat tct ttc tgc aag gtc ctg aca gcc tcc gat 3174
 Val Lys Pro Arg Phe His Ser Phe Cys Lys Val Leu Thr Ala Ser Asp
 125 130 135

aca agc act cat ggt gga ttt tct gtt cta agg aaa cat gct aat gaa 3222
 Thr Ser Thr His Gly Gly Phe Ser Val Leu Arg Lys His Ala Asn Glu
 140 145 150

tgc ctt cct cca ttg gtaatataag tgtgatcatt ttgtataggc tagactacgt 3277
 Cys Leu Pro Pro Leu
 155

ttccccccct gttttgacaa gttgttgaat tagctgtcgt gtttgttata ctttgttag 3336

gac ttg aac cag cag act ccg acc cag gaa ttg att gcg aaa gac ctt 3384
 Asp Leu Asn Gln Gln Thr Pro Thr Gln Glu Leu Ile Ala Lys Asp Leu
 160 165 170 175

cat gac gtg gag tgg cgc ttc aag cat ata ttt aga g gtaattgttt 3431
 His Asp Val Glu Trp Arg Phe Lys His Ile Phe Arg
 180 185

tgtttgtaga gtgtaacaga agatatcaat gaagctttat catgtattgt aaaggtcaaa 3491

agtcatccgt ctttgtttta attataacag gc caa cct cgg aga cat tta ctt 3544
 Gly Gln Pro Arg Arg His Leu Leu

030460

	190	195	
acc aca ggg tgg agt acc ttt gtt tct tca aag aaa tta gtg gca ggg			3592
Thr Thr Gly Trp Ser Thr Phe Val Ser Ser Lys Lys Leu Val Ala Gly			
	200	205	210
gat tct ttt gta ttc ttg ag gtatctctct ctggctcctag cttctcgtat			3642
Asp Ser Phe Val Phe Leu Arg			
	215		
gagtatgata tttgattgca ttgtctatca ctattgcatg tcatgtcata tatccagaac			3702
agttaatggt ggtttgtaa taatcatatt ctaatggata tgtacgctct ag g ggt			3758
			Gly
aat aat gga cag ctg cga gtt ggg gtc aaa agg ctt gtt cgc cag cag			3806
Asn Asn Gly Gln Leu Arg Val Gly Val Lys Arg Leu Val Arg Gln Gln			
220	225	230	235
agc tca atg ccg tca tcg gtg atg tca agc cag agc atg cac cta gga			3854
Ser Ser Met Pro Ser Ser Val Met Ser Ser Gln Ser Met His Leu Gly			
	240	245	250
gtc ttg gct aca gca tct cat gct gtt aca acc cag aca atg ttt gtt			3902
Val Leu Ala Thr Ala Ser His Ala Val Thr Thr Gln Thr Met Phe Val			
	255	260	265
gtt tac tac aaa ccg ag gtttgtcaca tacacctct ttcaattatc			3949
Val Tyr Tyr Lys Pro Arg			
	270		
ccgtcatcct tacgcagtag agatcatttt catgccagag aacatactaa atctttcata			4009
tgctcttcca attttctgct ttgacaacct tcag a acc act cag ttc atc gta			4062
		Thr Thr Gln Phe Ile Val	
		275	
ggc gtc aac aaa tac tta gag gct ctt aaa cat gaa tat gca gtt ggc			4110
Gly Val Asn Lys Tyr Leu Glu Ala Leu Lys His Glu Tyr Ala Val Gly			
280	285	290	295
atg cga ttc aaa atg cag ttt gaa gcc gaa ggg aat cct gat aga ag			4157
Met Arg Phe Lys Met Gln Phe Glu Ala Glu Gly Asn Pro Asp Arg Arg			
	300	305	310
gtagtgatat caattactcg cttagctccat tttgatttat ctgtcttact ttcctttata			4217
gtttgtttaa aagaatgcat ctttcccttt ttggctttaa ttcaacttaa attccgtgcc			4277
aagttaaaac cagcaaataa attgaaatgg tgggagtatt cagaagtcct ccaattagat			4337
gtggaagtct ttgatcaaga tgtttatttg ccaactgctt agttctgaca tgtatttggt			4397
tgggctctcc cctattatct ctcag a ttt atg ggc act ata gtt gga att gat			4450
		Phe Met Gly Thr Ile Val Gly Ile Asp	
		315	320
gat ctt tct tca cag tgg aaa aat tct gcg tgg cga tcc ttg aag			4495
Asp Leu Ser Ser Gln Trp Lys Asn Ser Ala Trp Arg Ser Leu Lys			
	325	330	335
gttgatatct acatttatat ttcagcaata ttctttaagt tcaattggaa atcaccaatt			4555

030460

ctcccttcgt tccag gtc cga tgg gac gag cct gca gcc att gca agg cct 4606
Val Arg Trp Asp Glu Pro Ala Ala Ile Ala Arg Pro
340 345

gac aga gtt tct cct tgg gaa att aaa cct tat gtg tgt tca att cca 4654
Asp Arg Val Ser Pro Trp Glu Ile Lys Pro Tyr Val Cys Ser Ile Pro
350 355 360

aat gtc ctt gtc cca cca acc gca gag aag aac aaa agg cat cgg cta 4702
Asn Val Leu Val Pro Pro Thr Ala Glu Lys Asn Lys Arg His Arg Leu
365 370 375

cat agt gaa atc aaa ata tca g gtctgaatga aaattctcaa cagcatgggtg 4754
His Ser Glu Ile Lys Ile Ser
380 385

gtttttcatg tgttggttgc tgatatttta atttccattt tcattttcctt aattatcttg 4814

cctttctttt cctggttag aa caa cct tca tcc tca aat gct tcg gcg gtt 4864
Glu Gln Pro Ser Ser Ser Asn Ala Ser Ala Val
390 395

tgg aat cct tcc ctt cga tcg cct cag ttt aac acc ttt ggc atc aac 4912
Trp Asn Pro Ser Leu Arg Ser Pro Gln Phe Asn Thr Phe Gly Ile Asn
400 405 410

agc agt act aat tgc gca tta gcg tct ctt aca gag agt ggt tgg cag 4960
Ser Ser Thr Asn Cys Ala Leu Ala Ser Leu Thr Glu Ser Gly Trp Gln
415 420 425

ctt cct cat tta aat act tca ggt atg ctt gtg gat gag cca gaa gac 5008
Leu Pro His Leu Asn Thr Ser Gly Met Leu Val Asp Glu Pro Glu Asp
430 435 440 445

ggt agg agt gct cca act tgg tgt ggt ttt cca tgc gtt ttg gcc ccg 5056
Gly Arg Ser Ala Pro Thr Trp Cys Gly Phe Pro Cys Val Leu Ala Pro
450 455 460

cag ttc ggt caa ggg act aat cag ccg att gtt att cct act gat ggg 5104
Gln Phe Gly Gln Gly Thr Asn Gln Pro Ile Val Ile Pro Thr Asp Gly
465 470 475

aga aaa tgt gat acc aaa aaa acc tgt aga tta ttt ggt att gac ttg 5152
Arg Lys Cys Asp Thr Lys Lys Thr Cys Arg Leu Phe Gly Ile Asp Leu
480 485 490

aaa agt tcc tca att agc act act gag gca cga cta cag cta cag cca 5200
Lys Ser Ser Ser Ile Ser Thr Thr Glu Ala Arg Leu Gln Leu Gln Pro
495 500 505

gcc gcc att tct tgt gtc ttt gca gag aga gca cct cca aac acg gtg 5248
Ala Gly Ile Ser Cys Val Phe Ala Glu Arg Ala Pro Pro Asn Thr Val
510 515 520 525

cct gct ggt gat tca gat caa aag tct gag ctt tca gta gac ttc aaa 5296
Pro Ala Gly Asp Ser Asp Gln Lys Ser Glu Leu Ser Val Asp Phe Lys
530 535 540

gat caa atg caa ggc cat ttg cgg tta ccc cta aag gag gtt caa agc 5344
Asp Gln Met Gln Gly His Leu Arg Leu Pro Leu Lys Glu Val Gln Ser
545 550 555

030460

aag cag agt tgt tcc acc agg tct cgc aca aag gtattaaatc aaaagccaaa 5397
Lys Gln Ser Cys Ser Thr Arg Ser Arg Thr Lys
560 565

aaattgcatt cttaccaact catttttcgcc acaaaacata ttattaaact ctctaacatc 5457

ttttcacatg tggaatccct tgagaag gtg caa atg caa ggc gta gct gta ggt 5511
Val Gln Met Gln Gly Val Ala Val Gly
570 575

cgt gca gtg gat tta acc ata ttg aaa gga tac gat gag ctt aca aag 5559
Arg Ala Val Asp Leu Thr Ile Leu Lys Gly Tyr Asp Glu Leu Thr Lys
580 585 590

gag ctt gag gag atg ttt gaa atc caa gga gag ctt cag tca cga cag 5607
Glu Leu Glu Glu Met Phe Glu Ile Gln Gly Glu Leu Gln Ser Arg Gln
595 600 605

aaa tgg ggg atc ttg ttt aca gat gat gaa ggg gat aca atg ctt atg 5655
Lys Trp Gly Ile Leu Phe Thr Asp Asp Glu Gly Asp Thr Met Leu Met
610 615 620 625

ggg gat tat ccg tgg ca gtaagttctc tctcacttaa aaaaatttaa 5702
Gly Asp Tyr Pro Trp Gln
630

gactgaatac atatacaacc actgcataag atcttttcta caacctgtaa tttaacacat 5762

cacttaaadc acttaattgc ag a gac ttt tgc aat gtg gtg agg aag att 5812
Asp Phe Cys Asn Val Val Arg Lys Ile
635 640

ttc att tgt tca agt cag gat atg aaa aaa ttg acc ctg tct cgc gca 5860
Phe Ile Cys Ser Ser Gln Asp Met Lys Lys Leu Thr Leu Ser Arg Ala
645 650 655

gac agt taa gcagctcctt tcaaatgaaa tgatggcgga agatggtgaa 5909
Asp Ser

agttaaagac tccgcctttt gaagtgggtac cgttttgtga tctctttggc ttcattctct 5969

atatatagta ggaaagaacg acaggttggt gacatagcaa ggcgtagaag cttgttttta 6029

cgctcttttt agcctagtgc agctccgttt tgagagcagt taagtaagta actagttata 6089

ataggataag actagtaaaa atatagtact agaagtagta aaaagttaag ggtgttctct 6149

aatggggagt ctatatagta gtagtttatg tagttttcta ttcgcgcggt aacctgtaaa 6209

tactcatgtg ccattgtagt attctggaaa tactacaatg tatggtcttg ttaacgtgct 6269

ttatgcctta tcttatatga aaactccatg gtggagattg ctctgtactt gctctttctg 6329

tatgactttt gtgatgcaca atagggattt cttgtctaaa tttagactct tttggcacia 6389

tcatgcatca ctttgtaact ttccccctta ctgaacaaaa aaatctttca aaacgctcct 6449

tcgctgtgtg gtttgtttta ttctttgcta aagggtgatc ctaacattta aattagatac 6509

cgttttcttt actataaggg tgacttgaac tcaaacctg ttttattagt atgttactct 6569

attdagaagt ttaataattt attagatatg acatttctat ttaccttgct atttctttta 6629

acaatattta cctttagatt tatataagtt tttgattcat taactgactt tggttaagat 6689
 gttgagtgca aaataaatag atggttcatc ttttgagcta gcgtagagtc attttccttt 6749
 aaactttata aagcacttac aatcacatat ttgtgcattc ttagtgcacg tttgaccatg 6809
 gataattttc actattttat ggaactgtat attataatth ttttggatt agaagaactc 6869
 aaaaagactc ttttcataat tttattccga atcactcgta caaaaatcaa aaaacaattt 6929
 caagttgtat tcattttcaa gcaaaagttc aatttgtcac tatcacttgt aacacaaata 6989
 ttttcctttt cgaatttcac aattttaata ttctaagttc ctttttgaga acttttagtg 7049
 aaaggaaaat tgggctttgt gaattgtttg gtcttcaata tccctatcct agctaggaag 7109
 agtgtccata tagtcatggg cctcatgagt tgtcaaatgt tacgtaaagg tatttatctt 7169
 tgcattgagt tttggtcacg ctcaaaactt ctttattata agtctgagtc tttgtgttat 7229
 gtatccatgc ttggcttgca tgatgtttgt gtcattccta atcttattga atggactata 7289
 aaggacttag tcaagtataa ctataaaatg acgatagctt atagacaact tcgtagttgt 7349
 tggagtatac aacacgctga catcgacttc ttggagttta gtaatcataa ttttttttaa 7409
 aaaaaacaaa tctcctcaat caacttcttg attttagtag taatccatcg attcaggtac 7469
 attcatgacg tgatgtgttc gattaatatt t 7500

<210> 5
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> праймер Slactin прямой

<400> 5
 ggactctggt gatggtgtta g 21

<210> 6
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> праймер Slactin обратный

<400> 6
 ccgttcagca gtagtggtg 19

<210> 7
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая Sequence

<220>
 <223> праймер SlARF9 прямой

<400> 7 cgtaggcgtc aacaataact tagagg	26
<210> 8 <211> 28 <212> ДНК <213> Синтетическая последовательность	
<220> <223> праймер SlARF9 обратный	
<400> 8 tccactgtga agaaagatca tcaattcc	28
<210> 9 <211> 27 <212> ДНК <213> Синтетическая последовательность	
<220> <223> праймер SlARF9 прямой	
<400> 9 caccatggca actataaatg ggtggtg	27
<210> 10 <211> 23 <212> ДНК <213> Синтетическая последовательность	
<220> <223> праймер SlARF9 обратный	
<400> 10 ttaactgtct gcgcgagaca ggg	23
<210> 11 <211> 36 <212> ДНК <213> Синтетическая последовательность	
<220> <223> праймер SlARF9 прямой	
<400> 11 aaaaagcagg ctgtccsacc aaccgcaag aagaac	36
<210> 12 <211> 37 <212> ДНК <213> Синтетическая последовательность	
<220> <223> праймер SlARF9 обратный	
<400> 12 agaaaagctg ggtgctgtag tcgtgcctca gtagtgc	37

<210>	13	
<211>	34	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетическая последовательность	
<220>		
<223>	праймер SlARF9 промотор прямой	
<400>	13	
	caccttttca aagaggtgtg acatttttcaa таас	34
<210>	14	
<211>	32	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетическая последовательность	
<220>		
<223>	праймер SlARF9 промотор обратный	
<400>	14	
	саaccttcaa ttссааааас тааагаасас сс	32
<210>	15	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетическая последовательность	
<220>		
<223>	прямой праймер F-4008	
<400>	15	
	aatttgagaa ttttgagct tttt	24
<210>	16	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетическая последовательность	
<220>		
<223>	обратный праймер R-4009	
<400>	16	
	агаacttagc cttgaatcaa cca	23
<210>	17	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетическая последовательность	
<220>		
<223>	Прямой праймер F-4010	
<400>	17	
	tgagtttcag gtaaaaaaga tgc	23
<210>	18	

<211> 24
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность
 <220>
 <223> обратный праймер R-4011

 <400> 18
 асагаааааа асаасаасас агаа 24

 <210> 19
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Прямой праймер F-4030

 <400> 19
 сссctgtttt гасаagtgtg tg 22

 <210> 20
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> обратный праймер R-4031

 <400> 20
 cattgatatc ttctgttaca ctctac 26

 <210> 21
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Прямой праймер F-4032

 <400> 21
 gtagagtgta асагааgata tcaatg 26

 <210> 22
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> обратный праймер R-4033

 <400> 22
 ссагагагаg атастсааg аатаc 25

 <210> 23
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> синтетическая

<220>		
<223>	ген-специфический праймер для прогулки по геному	
<400>	23	
	ttcttcagcc aggaaatgac tattgataac tcg	33
<210>	24	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	синтетическая	
<220>		
<223>	вложенный праймер для прогулки по геному	
<400>	24	
	ggagaattca tattcggctg agac	24
<210>	25	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	синтетическая	
<220>		
<223>	прямой праймер для канамицин-устойчивого гена	
<400>	25	
	gactgggсac aасаgасаат сg	22
<210>	26	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	синтетическая	
<220>		
<223>	обратный праймер для канамицин-устойчивого гена	
<400>	26	
	gтссагаага асггтсааg аagg	24
<210>	27	
<211>	34	
<212>	ДНК	
<213>	синтетическая	
<220>		
<223>	прямой праймер для AtARF9 увеличения промотора	
<400>	27	
	ааааgсagg сttggтggтg ggtttтаagg catc	34
<210>	28	
<211>	37	
<212>	ДНК	
<213>	синтетическая	
<220>		
<223>	обратный праймер для AtARF9 увеличения промотора	

<400> 28		
agaaaagctg ggtcacacag tctctctatc tctctcc		37
<210> 29		
<211> 30		
<212> ДНК		
<213> синтетическая		
<220>		
<223> прямой праймер для AtARF9 RT-PCR		
<400> 29		
agaagccatg agcaataagt tctctgtagg		30
<210> 30		
<211> 26		
<212> ДНК		
<213> синтетическая		
<220>		
<223> обратный праймер для AtARF9 RT-PCR		
<400> 30		
gggagcagtc tttcacacca ataacc		26
<210> 31		
<211> 22		
<212> ДНК		
<213> синтетическая		
<220>		
<223> прямой праймер uidA		
<400> 31		
ctcctaccgt acctcgcatt ac		22
<210> 32		
<211> 19		
<212> ДНК		
<213> синтетическая		
<220>		
<223> обратный праймер uidA		
<400> 32		
ccggttgactg cctcttcgc		19

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нетрансгенное растение семейства Solanaceae (пасленовых) или рода Solanum, содержащее аллель Фактора 9 Ответа Ауксина (slarf9) в своем геноме, причем аллель slarf9 представляет собой аллель, кодирующий белок, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, отличающееся тем, что указанный аллель slarf9 содержит одну или более мутаций в его нуклеотидной последовательности, причем указанные мутации в аллеле slarf9 локализованы в экзоне 2 или в экзоне 7 или на границах интрона/экзона экзона 2 или экзона 7, и в результате указанных мутаций происходит замена глицина на серин в положении 52, и/или замена аргинина на триптофан в положении 191, и/или замена гистидина на тирозин в положении 193 последовательности SEQ ID NO: 2, и в результате указанных мутаций указанное растение, содержа-

шее указанный мутантный аллель в своем геноме, дает плоды значительно большего размера по сравнению с растением, содержащим аллель *slarf9* дикого типа в своем геноме, причем плоды значительно большего размера являются плодами, у которых средний экваториальный диаметр, и/или средний объем, и/или средняя масса свежего плода значительно больше, чем у плодов растений, содержащих аллель *slarf9* дикого типа в своем геноме.

2. Растение по п.1, в котором мутации в аллеле *slarf9* локализованы на границах интрона/экзона экзона 7.

3. Растение по п.1 или 2, в котором указанный мутантный аллель *slarf9* присутствует в гомозиготной форме.

4. Растение по любому из предыдущих пунктов, средний размер плода которого составляет по меньшей мере 110% размера плода растения, содержащего аллель *slarf9* дикого типа.

5. Растение по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой гибридное растение.

6. Часть растения, в том числе плод или семя, по любому из предыдущих пунктов, содержащая в своем геноме указанный мутантный аллель *slarf9*.

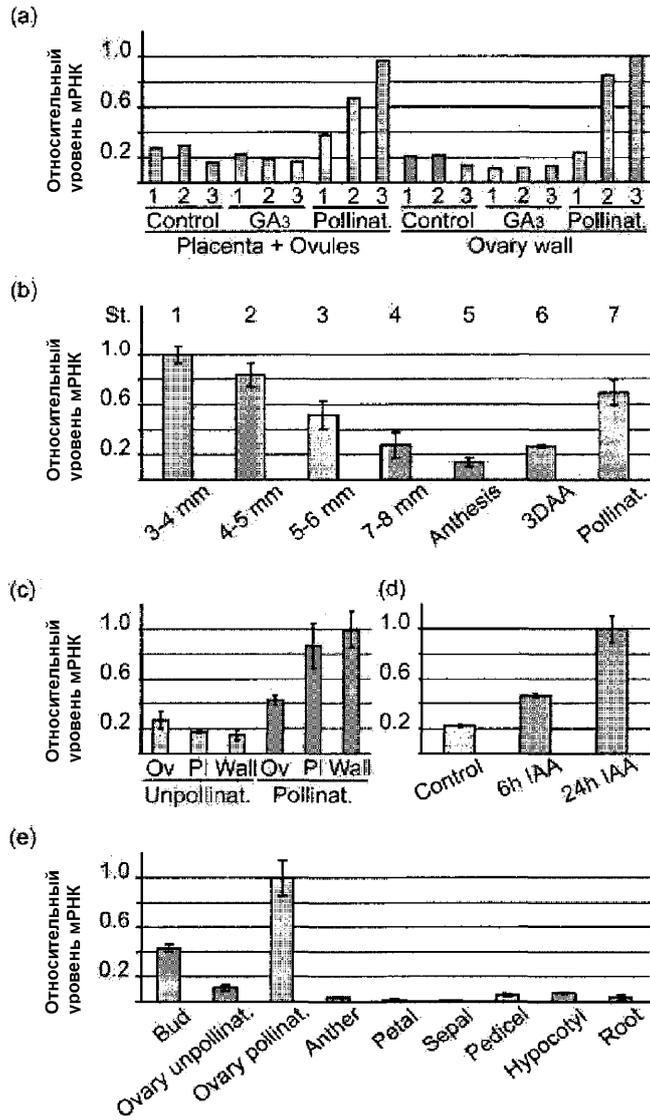
7. Растение по п.1, причем указанное растение является растением вида *Solanum Lycopersicum*.

8. Растение по п.1, где среднее количество клеток в ткани перикарпия плодов и/или количество клеточных слоев в ткани перикарпия значительно больше, чем в плодах растений, имеющих аллель *slarf9* дикого типа в своем геноме.

9. Применение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок SIARF9 (мутантной аллели *slarf9*), для получения нетрансгенных растений семейства Solanaceae (пасленовых) или рода *Solanum*, которые дают плоды большего размера по сравнению с растениями дикого типа, причем белок SIARF9 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и причем указанная последовательность нуклеиновой кислоты содержит одну или более мутаций, локализованных в экзоне 2 или в экзоне 7 или на границах интрона/экзона экзона 2 или экзона 7, и в результате указанных мутаций происходит замена глицина на серин в положении 52, и/или замена аргинина на триптофан в положении 191, и/или замена гистидина на тирозин в положении 193 последовательности SEQ ID NO: 2, и в результате указанных мутаций указанное растение, содержащее указанный мутантный аллель в своем геноме, дает плоды значительно большего размера по сравнению с растением, содержащим аллель *slarf9* дикого типа в своем геноме, причем плоды значительно большего размера являются плодами, у которых средний экваториальный диаметр, и/или средний объем, и/или средняя масса свежего плода значительно больше, чем у плодов растений, содержащих аллель *slarf9* дикого типа в своем геноме.

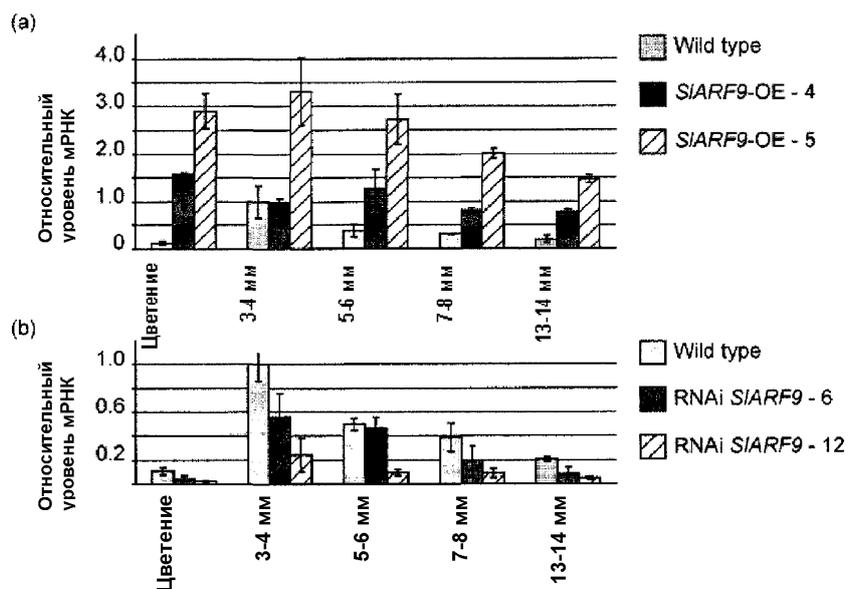
10. Применение по п.9, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок SIARF9, представляет собой аллель *slarf9*, получаемый из растений, выращиваемых из семян, депонированных под номерами NCIMB 41827, 41828, 41829, 41830 или 41831.

11. Применение по п.9 или 10, где указанное растение является растением вида *Solanum Lycopersicum*.



bud – почка
 ovary unpollinat – завязь неопыленная
 ovary pollinat – завязь опыленная
 anther – пыльник
 petal – лепесток
 sepal – чашелистик
 pedicel – плодоножка
 hypocotyl – гипокотиль
 root – корень

Фиг. 1



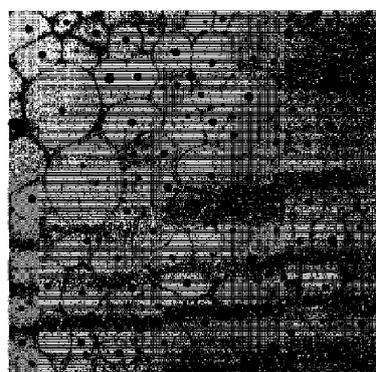
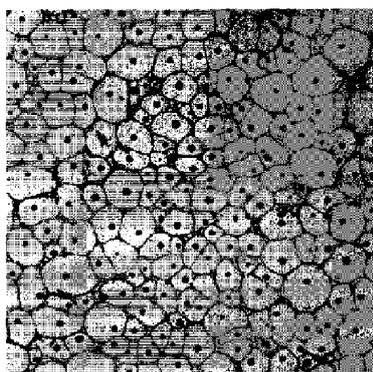
Фиг. 2



Фиг. 3

RNAi SIARF8 (M6-3)

дикий тип



Фиг. 4

