



등록특허 10-2538812



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년06월01일  
(11) 등록번호 10-2538812  
(24) 등록일자 2023년05월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/82* (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
*C12N 15/829* (2013.01)  
*C07K 14/415* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-7037432  
(22) 출원일자(국제) 2017년05월19일  
심사청구일자 2020년05월19일  
(85) 번역문제출일자 2018년12월24일  
(65) 공개번호 10-2019-0008958  
(43) 공개일자 2019년01월25일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/062093  
(87) 국제공개번호 WO 2017/202715  
국제공개일자 2017년11월30일  
(30) 우선권주장  
16171462.1 2016년05월26일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
(56) 선행기술조사문헌  
WO2001074144 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 18 항

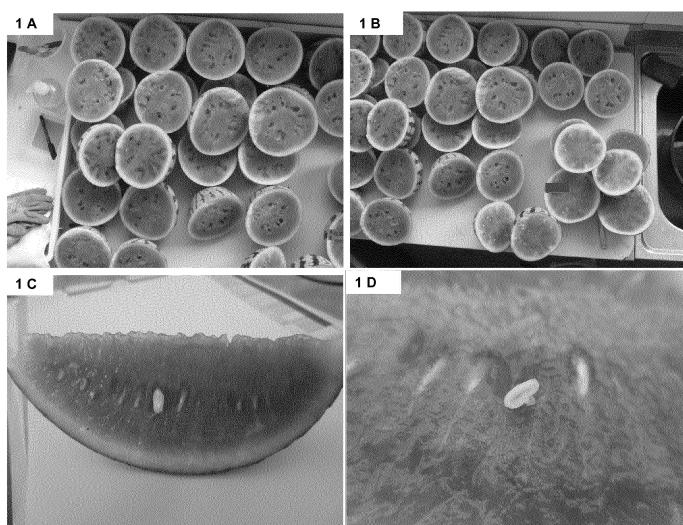
심사관 : 최준호

- (54) 발명의 명칭 **씨없는 과실 생산 식물**

**(57) 요 약**

본 발명은 씨없는 과실 생산 식물에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 상기 식물의 생산 방법, 및 씨없는 과실의 생산을 위한, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산의 용도를 포함한다.

**대 표 도**



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 수박 식물 세포로서, 여기서 돌연변이체 대립유전자는 상응하는 야생형 대립유전자와 비교하여 유전자 발현을 감소시키거나 유전자 발현이 일어나지 않게 하는 하나 이상의 조절 서열에서의 돌연변이를 포함하거나, 또는 돌연변이체 대립유전자는 시클린 SDS 유사 단백질의 기능 감소 또는 기능 상실을 초래하는, 야생형 대립유전자에 의해 코딩되는 단백질과 비교하여 하나 이상의 아미노산의 결실, 말단결단, 삽입 또는 대체를 포함하는 단백질을 코딩하고,

야생형 식물 세포의 시클린 SDS 유사 단백질은

- a) 서열식별번호: 2 하에 제공된 아미노산 서열을 수반한 단백질을 코딩하는 핵산 분자 또는
- b) 서열식별번호: 1 하에 제시된 게놈 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자

에 의해 코딩되는 것인 수박 식물 세포.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 돌연변이체 대립유전자가, 시클린 SDS 유사 단백질의 보존된 시클린\_C 도메인 및/또는 시클린\_N 도메인에서 하나 이상의 아미노산이 삽입, 대체 또는 결실되거나 또는 시클린\_C 도메인 및/또는 시클린\_N 도메인의 전부 또는 일부가 부재하는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 것인 수박 식물 세포.

#### 청구항 3

제1항에 따른 식물 세포를 포함하는 수박 식물.

#### 청구항 4

제3항에 따른 수박 식물로 성장할 수 있는 종자.

#### 청구항 5

- a) 수박 식물 집단 내에 돌연변이를 도입하는 단계,
- b) 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 대립유전자에서의 돌연변이를 갖는 식물을 확인하는 단계로서, 여기서 야생형 시클린 SDS 유사 단백질은 서열식별번호: 1의 게놈 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 코딩되는 것인 단계,
- c) 상기 식물이 웅성 가임인지의 여부 및 상기 식물 또는 자가 수분에 의해 생산된 자손 식물이 씨없는 과실을 생산하는지의 여부를 결정하는 단계, 및
- d) 단계 b)의 돌연변이체 대립유전자의 적어도 하나의 카페를 포함하는 식물을 선별하는 단계  
를 포함하는, 수박 식물의 생산 방법.

#### 청구항 6

- a) 수박 식물 집단 내에 돌연변이를 도입하는 단계,
- b) 씨없는 과실을 생산하는 웅성 가임 수박 식물을 선별하는 단계,
- c) b) 하에 선별된 수박 식물이 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 대립유전자에서의 돌연변이를 갖는지 검증하고, 이러한 돌연변이를 포함하는 식물을 선별하는 단계, 및
- d) c) 하에 수득된 수박 식물을 성장시키고/재배하는 단계

를 포함하며, 여기서 야생형 시클린 SDS 유사 단백질은 서열식별번호: 1의 게놈 뉴클레오티드 서열을 포함하는

핵산 분자에 의해 코딩되는 것인, 수박 식물의 생산 방법.

### 청구항 7

제5항 또는 제6항의 방법에 의해 수득된 수박 식물.

### 청구항 8

제1항 또는 제2항에 따른 수박 식물 세포를 포함하거나 또는 제5항 또는 제6항의 방법에 의해 수득된 수박 식물의 부분이며, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자의 대립유전자에서의 돌연변이를 갖는 세포를 포함하는 수박 식물의 부분.

### 청구항 9

제1항 또는 제2항에 따른 수박 식물 세포를 포함하거나 또는 제3항에 따른 수박 식물 또는 제5항 또는 제6항의 방법에 의해 수득된 수박 식물로부터 수득가능한 번식 재료이며, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자의 대립유전자에서의 돌연변이를 갖는 세포를 포함하는 번식 재료.

### 청구항 10

제1항 또는 제2항에 따른 수박 식물 세포를 포함하거나, 또는 제3항에 따른 수박 식물 또는 제5항 또는 제6항의 방법에 의해 수득된 수박 식물로부터 수득가능하거나, 또는 상기 식물 세포를 포함하거나 또는 상기 식물로부터 수득가능한 번식 재료로부터 수득가능한 수박 과실이며, 여기서 상기 번식 재료는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자의 대립유전자에서의 돌연변이를 갖는 세포를 포함하는 것인 수박 과실.

### 청구항 11

제3항에 있어서, 상기 수박 식물이 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합 성인 수박 식물.

### 청구항 12

제11항에 따른 수박 식물을 성장시키고, 이러한 식물의 수분을 가능하게 하고, 씨없는 과실을 수확하는 것을 포함하는, 씨없는 과실의 생산 방법.

### 청구항 13

제9항에 있어서, 번식 재료가 영양 번식된 식물인 번식 재료.

### 청구항 14

제1항에 있어서, 돌연변이체 대립유전자가, 상응하는 야생형 시클린 SDS 유사 단백질과 비교하여 적어도 25개의 아미노산이 아미노산 서열의 N-말단 끝 또는 C-말단 끝으로부터 누락된 단백질을 코딩하는 것인 수박 식물 세포.

### 청구항 15

제1항에 있어서, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 수박 식물 세포로서, 여기서 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 2의 야생형 단백질의 아미노산 358 내지 562가 결여되거나 서열식별번호: 2의 야생형 단백질의 아미노산 224 내지 562가 결여된 말단절단된 단백질을 코딩하는 것인 수박 식물 세포.

### 청구항 16

제1항에 있어서, 돌연변이체 대립유전자가 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 18의 단백질을 코딩하는 것인 수박 식물 세포.

### 청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 식물 세포를 포함하는 수박 식물.

## 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 수박 식물이 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 수박 식물.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

본 발명은 씨없는 과실 생산 식물에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 상기 식물의 생산 방법, 및 씨없는 과실의 생산을 위한, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산의 용도를 포함한다.

### 배경 기술

[0002]

대부분의 상업적인 씨없는 과실은, 그의 과실이 정상적으로는 과육 전반에 걸쳐 분포되어 있는 비교적 크고 단단한 수많은 씨를 함유하는 식물로부터 개발되어 왔다. 씨없는 과실은, 예를 들어, 수박, 토마토, 오이, 가지, 포도, 바나나, 감귤류, 예컨대 오렌지, 레몬 및 라임에 대하여 공지되어 있다. 씨없는 과실의 섭취가 일반적으로 더 용이하고 더 편리하기 때문에, 가치가 큰 것으로 간주된다.

[0003]

과실의 발달은 정상적으로, 꽃의 배주 구획에 있는 하나 이상의 난 세포가 꽃가루로부터의 응핵에 의해 수정될 때부터 시작된다.

[0004]

씨없는 과실은 2가지 상이한 현상으로부터 비롯될 수 있다. 일부 경우에 과실은 꽃가루에 의한 배주의 수정 없이 발달되며, 이것이 단위결실로서 공지된 현상이다. 다른 경우에는, 수분 후 종자 (배아 및/또는 내배유)의 성장이 억제되거나 또는 종자가 조기에 죽고 과실의 나머지가 계속 성장할 때 씨없는 과실이 발생한다 (위단위결실). 단위결실과는 달리, 위단위결실은 과실 성장의 개시를 위해 수분이 필요하다.

[0005]

씨없는 오렌지 과실이 단위결실에 대한 한 예이다. 일부 오렌지 품종 (예를 들어 네이블(Navel))은 생육성 꽃가루를 생산하지 않는다. 그러나 이들은 다른 품종으로부터의 꽃가루와 타가 수분될 수 있다. 응성 불임 품종이 과수원에서 성장하는 경우에만, 수분이 없을 것이고 단위결실의 씨없는 과실이 생산될 것이다. 각각의 오렌지 나무의 번식은 통상적으로, 커팅에 이어 또 다른 뿌리줄기와의 접목에 의해 행해진다.

[0006]

씨없는 바나나는 삼배체이다. 일부 경우에는 수분이 정상적일 수 있지만, 대부분의 과실은 씨가 없다. 이는 감수분열 동안 염색체의 부적절한 분할을 초래하고 생육할 수 없는 꽃가루의 생산으로 이어지는 홀수의 염색체 세트 (3x)에 의해 설명된다. 수정하지 않고서도, 삼배체 바나나는 또한 씨없는 과실이 달리게 하고 이를 발달 시킬 수 있다. 수분이 일어난 경우일지라도, 300개 과실 중 많아 봐야 1개가 몇 개의 씨를 포함한다. 이는 상기 설명된 이유로 인해, 삼배체 꽃가루가 생육할 수 없기 때문일 수 있다. 따라서, 바나나 식물은 일반적으로 단위결실인 것으로 볼 수 있다. 바나나 식물은 통상적으로, 재배종이 계속되도록 자가 및 옮겨 심을 수 있는, 주요 줄기의 밑 부분에 있는 측면의 어린 가지 또는 결순으로부터 무성적으로 번식된다. 재배자는 또한, 특히 병이 없는 재료를 생산하기 위하여, 조직 배양을 통해 바나나를 번식시킨다.

[0007]

씨없는 오이, 씨없는 호박 및 씨없는 가지가, 예를 들어 수분이 손상되는 조건 (예를 들어, 저온) 하에서, 수분 없이 씨없는 과실을 생산할 수 있는 (단위결실) 작물의 예이다. 그럼에도 불구하고, 상업적인 품질의 과실은 이러한 조건 하에서 생산될 수 있다. 그러나 이들 작물 모두는 수분 시 씨 보유 과실을 생산할 수 있다. 따라서, 이들 작물은 조건적 단위결실이다. 작물의 번식은 자가 또는 타가 수분, 시험관내 번식, 및 접목에 의해 행해질 수 있다.

[0008]

토마토 돌연변이체로부터는, 이들이 정상적인 수분/수정이 손상되는 조건 하에 (예를 들어 저온의 환경 하에) 씨없는 과실을 생산할 수 있는 것으로 또한 공지되어 있다. 따라서, 이들 돌연변이체 또한 조건적 단위결실이다. 이러한 표현형을 나타내는 것으로 공지된 돌연변이체는 *pat*, *pat-2* 및 *pat-3/pat-4* 시스템이다. 이들 돌연변이의 기초가 되는 유전자는 공지되어 있지 않고 상기 *pat-3/pat-4* 시스템은 다수의 로커스에 좌우되는 것으로 보인다.

[0009]

단위결실은 또한, 유전적 변형을 통해 몇 가지 식물 종 내로 도입되어 왔다. 배추 및 태좌 특이적 *DefH9* 프로모터의 제어 하에 옥신 합성을 부여하는 박테리아 트립토판 모노옥시게나제 (*iaaM*)의 발현이 오이 (Yin et al., 2006, Clular & molecular Biotech. Letters 11, 279-290), 가지 (Acciarri et al., 2002, BMC Biotech. 2(4)), 토마토 (Rotino et al., 2005, BMC Biotech. 5(32)) 및 담배에서 단위결실을 유도하였다.

- [0010] 이를 트랜스제닉 식물은 종자 및 과실 발달에서의 식물 호르몬의 중요성을 입증한다. 그러한 종자 및 과실 발달 외에도, 강력하게 몇 가지 식물 호르몬의 제어 하에 있는 다른 요인이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 과실의 씨가 없음의 논리적인 결과를 포함한 단위결실은 또한, 예를 들어, 식물 호르몬, 특히 옥신 또는 지베렐린의 외인성 적용에 의해 유도될 수 있다 (Ruan et al., Trends in Plant Sci. 17(11), 1360-1385).
- [0011] 육종자에 의해 생산된 씨없는 수박이 위단위결실 작물에 대한 예이다. 정상적인 수박 식물은 이배체 ( $2n$ )이다. 씨없는 과실 생산 수박은 웅성 이배체 ( $2n$ ) 수박 식물을 자성 사배체 ( $4n$ ) 수박 식물과 교배함으로써 생산된 잡종이다. 이로써 생성된 F1 잡종 종자는 삼배체 ( $3n$ )이다. F1 잡종 식물에서의 착과를 유도하기 위해서는 수분이 필요하다. 삼배체 ( $3n$ ) F1 잡종 식물은 가임성 꽃가루를 생산하지 않기 때문에, 소위 꽃가루 매개자 또는 수분자 식물을 동일한 밭에 심어야 한다. 꽃가루 매개자 식물은 이배체 ( $2n$ )이다. 모든 F1 잡종 식물을 수분시키기에 충분한 꽃가루를 제공하기 위해서는 일반적으로 꽃가루 매개자 대 잡종 식물의 비를 대략 1 대 3으로 하여 소정의 스킴으로 심어야만 한다. 이배체 ( $2n$ ) 꽃가루 매개자와 자성 삼배체 ( $3n$ ) 잡종 식물의 꽃 간의 타가 수분은 착과를 유도하고, 상기 삼배체 잡종 식물 상에 씨없는 삼배체 과실의 생산을 초래한다. F1 잡종의 이배체 ( $2n$ ) 및 사배체 ( $4n$ ) 부모는 각각 씨 보유 과실을 생산하고, 둘 다 자가 수분에 의해 서로 독립적으로 번식될 수 있다.
- [0012] 씨없는 포도는 단위결실 또는 위단위결실 중 하나인 식물로부터 생산될 수 있다. 품종 블랙 코린트(Black Corinth)가 단위결실인 반면, 술타니나(Sultanina)는 위단위결실이다. 덩굴 식물은 일반적으로, 커팅한 다음 연속해서 또 다른 뿌리줄기와 접목시킴으로써 번식된다.
- [0013] 감수분열에서의 불규칙성이 씨없는 과실을 생산하는 식물을 초래하는 요인일 수 있다. 씨없는 과실을 생산하는 식물에 대한 예가 문헌 [Zhang et al. (2012, Scientia Horticulture 140, 107-114)]에 제공되며, 이 문헌에는 씨없는 수박이 개시된다. 웅성 및 자성 불임 (MFS) 돌연변이체는 그의 종자를 감마선으로 조사한 후 F1-잡종의 자손으로부터 수득되었다. MFS 돌연변이체로부터의 꽃가루는 전혀 생육성이지 않았다. 웅성 가임 식물로부터의 꽃가루와 수분시킨 경우에, MFS 식물에 의해 씨없는 과실이 생산된다. 따라서 MFS 수박 식물은 위단위결실 성인 것으로 분류될 수 있다. 배주도 또한 거의 전적으로 생육될 수 없었으며, 이는 MFS 돌연변이체를 상이한 웅성 가임 식물로부터의 꽃가루와 타가 수분시킬 때 씨가 거의 생산되지 않았기 때문이다. 감수분열 동안 불완전한 시냅시스와 염색분체의 비정상적인 분리가 MFS 돌연변이체에서 관찰되었으며, 이는 웅성 및 자성 불임의 원인인 것으로 보였다. MFS 돌연변이체에 존재하는 상기 효과에 대해 책임이 있는 유전자는 확인되지 않았지만, MFS 돌연변이체에서의 표현형이 단일 열성 유전자에 기인한 것으로 예상된다.
- [0014] 문헌 [Pradillo et al. (2014, Frontiers in Plant Sci. 5, Article 23, doi: 10.3389/fpls.2014.00023)]에는 아라비돕시스(*Arabidopsis*)에서의 감수분열 동안 상동 재조합에 관여하는 유전자에 관한 관련 기술분야의 지식이 고찰된다.
- [0015] 문헌 [Azumi et al. (2002, EMBO J. 21(12), 3081-3095)]에는 웅성 감수분열에서 시냅시스 및 2가 형성 상의 결함을 가지며, 비록 덜한 정도이긴 하지만 자성 감수분열에서 유사한 결함을 갖는 아라비돕시스 돌연변이체의 단리가 기재되어 있다. 그러한 돌연변이가 "솔로 댄서(Solo Dancers)" (*sds*)로 지명되었고, 단일 열성 유전자로부터 유래되는 것으로 밝혀졌다. SDS 돌연변이체는 웅성 불임이고 자성 가임성이 상당히 손상되었다. *sds* 돌연변이에 대하여 동형접합성인 식물은 웅성 불임이지만, 적어도 사소한 정도로는 자성 가임이며, 이는 *sds* 돌연변이체 식물을 웅성 가임 식물로부터의 꽃가루와 타가 수분시킴으로써 입증되었다. 따라서 SDS 돌연변이체는 웅성 불임이고 자성 가임성이 상당히 손상되었다. *sds* 유전자는 시클린 유형 단백질 코딩 유전자에 속하는 것으로 확인되었고, 아라비돕시스 CDK, Cdc2a 및 Ccdc2b 단백질과 상호작용하는 것으로 입증되었다. 그러나 SDS는 미리 공지되지 않은 새로운 시클린 유형 단백질인 것으로 확인되었다. 문헌 [De Muyt et al. (2009, PLOS genet. 5(9) e1000654, doi: 10.1371/journal.pgen.1000654)]에는 *sds* 아라비돕시스 돌연변이체가 감수분열에서 재조합 결함을 갖는 것으로 확증되었고, 이러한 결함이 감수분열 동안 세포에서의 또 다른 단백질 (AtDMC1)의 부적당한 할당에 의해 유발된다는 것이 암시되었다.
- [0016] 상기 논의로부터, 식물이 씨없는 과실을 생산하는지를 결정하는 요인은 자연적으로 다수이며, 여러 가지 원인, 예를 들어 형태학적, 생리학적 및/또는 유전적 원인에 의해 야기될 수 있다는 것이 명백하다.
- [0017] 위단위결실성 작물에서 씨없는 과실을 생산하기 위해서는, 식물의 암꽃 부분이 수분되어야만 한다. 오늘날 성장되고 있는 위단위결실성 작물은 웅성 불임이다. 그 결과로서, 자성 식물 외에도, 상이한 웅성 가임 식물 (꽃가루 매개자 또는 수분자) 또한 동일한 밭에서 성장해야만 한다. 꽃가루 매개자 식물에 대해 사용된 면적이 씨없는 과실 생산 자성 식물에 대하여 이용가능한 면적의 비용이기 때문에, 재배 면적당 수확량은 감소된다. 일

반적으로, 꽃가루 매개자 식물은 자가 수분될 수도 있는 정상 식물이다. 그러나 꽃가루 매개자 식물에 의해 생산된 과실은 씨를 생산한다. 수박에서는, 꽃가루 매개자 식물이 정상적으로, 자가 수분 시 씨있는 과실을 생산하는 이배체 ( $2n$ )이며, 일부 경우에는 별도로 수확되고 판매될 수도 있다 (WO2012069539 참조). 상업적인 이유로 인해, 꽃가루 매개자 식물로부터의 상기 씨있는 과실은 씨없는 과실과 혼합되지 않아야만 한다. 따라서, 씨없는 과실과 씨있는 과실은 수확 시 또는 수확 후에 반드시 분리되어야 하므로, 기계 수확을 어렵게 하거나 또는 불가능하게 만들거나 또는 수확 후 추가 처리 단계가 필요할 수 있다. 취해야 할 부가의 예방 조치는 씨없는 과실 생산에서의 투입 비용을 증가시킨다. 또한, 꽃가루 매개자 식물은 꽃이 피고 충분히 생육성인 꽃가루가 생산되도록 발달되며, 이와 동시에 자성 식물 꽃과 그의 암술머리는 착과를 유도하기 위해 꽃가루를 받아들일 수 있다. 따라서, 꽃가루 매개자 식물은 개화 및 수정 시기와 관련하여 씨없는 과실을 생산하는 자성 식물에 적합해야 한다. 꽃가루 매개자 식물 및 각각의 자성 식물의 개화 시기가 충분히 동기화되지 않는다면, 수분이 발생하지 않거나 또는 불충분한 양의 상태로만 수분이 발생할 것이다. 그 결과로서 더 적은 수의 과실이 위 단위결실성 자성 식물에 의해 생산된다. 더욱이, 비, 열 등과 같은 기후 조건이, 유전자형적 상이한 자성 식물의 암술머리 가임성 시기와 상이하게 수분자 식물의 꽃가루 생산에 영향을 미칠 수 있다는 것이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 따라서, 기후 조건은 또한 꽃가루 매개자와 자성 식물의 가임성 시기의 비동기를 초래할 수 있으며, 이는 수확량 감소 효과를 수반한다.

[0018] 각각의 단점은 하기 본원에 기재된 본 발명의 식물에 적용가능하지 않다.

### 발명의 내용

[0019] 따라서, 본 발명의 목적은 현재 재배되고 있는 씨없는 과실 생산 식물의 단점을 극복하는 것이다.

[0020] 돌연변이유발된 M2 이배체 수박 식물 집단에서, 씨없는 과실을 생산하는 식물이 관찰되었다. 이러한 돌연변이체 식물이 EMB1로 지명되었다. 놀랍게도, 상기 식물의 꽃가루가 역교배물을 만드는데 사용될 수 있었다. 따라서, 관련 기술분야에 공지된 씨없는 과실 생산 식물과는 반대로, 본원에 개시된 식물은 웅성 가임이다. 상기 역교배물은 자가 수분되었고, 그로부터 수득된 식물의 25%가 씨없는 과실을 생산하였다. 씨없는 과실 표현형을 유발한 돌연변이체 대립유전자 (*emb1*)가 확인되었으며, 즉 *emb1*에 대해 동형접합성인 이배체 식물 (*emb1/emb1*)이 자가 수분되거나 또는 또 다른 식물로부터의 꽃가루에 의해 수분되는 경우, 이들은 씨없는 이배체 과실을 생산하였다. 따라서, 씨없는 과실 표현형은 *emb1* 대립유전자에서의 열성 돌연변이에 대해 동형접합성인 식물에 발생한다. 본 발명의 돌연변이체 *emb1* 대립유전자에 상응하는 야생형 대립유전자에 의해 코딩된 야생형 단백질은 시클린 SDS 단백질과 일부 유사성을 가지지만, 또한 이와 상당한 차이를 갖고 있으므로, "시클린 SDS 유사 단백질"로 지명되었다. 관련 기술분야에 공지된 시클린 SDS 단백질 및 그의 코딩 핵산 서열과 본원에 개시된 시클린 SDS 유사 단백질의 각각의 서열 간의 서열 동일성은 낮다. 식물에서의 표현형 효과에 관해서는, 시클린 SDS 단백질에서의 돌연변이를 갖는, 관련 기술분야에 공지된 식물이 웅성 불임 표현형을 갖는 반면, 시클린 SDS 유사 단백질에서의 돌연변이를 갖는, 본원에 개시된 식물은 웅성 가임이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 제1 실시양태는 식물 세포 또는 식물이 기능적인 야생형 시클린 SDS 유사 단백질을 포함하는 식물 세포 및 식물과 비교하여 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 식물 세포, 식물 부분 및 식물에 관한 것이다.

[0022] 본 발명의 맥락에서, "시클린 SDS 유사 단백질"은 그의 활성이 식물에서 감소되거나 또는 그의 발현이 전적으로 녹아웃되는 경우에, (예를 들어, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 돌연변이체 뉴클레오티드 서열에 대해 동형접합성인 식물에서) 그러한 식물에 의해 생산된 웅성 가임 꽃가루를 초래하지만, 이와 동시에, 자가 수분될 때 상기 식물의 씨없는 과실의 생산을 초래하는 단백질을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0023] 본 발명의 맥락에서, 특정 단백질의 "감소된 활성"은 상응하는 야생형 식물 세포 또는 상응하는 야생형 식물과 비교한 경우에 시클린 SDS 유사 단백질의 활성에서의 감소를 의미할 것이다. 감소는 한 측면에서, 유전자 발현의 전체 녹아웃, 또는 기능 상실 또는 감소된 기능의 시클린 SDS 유사 단백질의 생산을 포함할 것이며, 예를 들어 말단절단된 SDS 유사 단백질은 상실된 기능 또는 감소된 기능을 가질 수 있다. 활성에서의 감소는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자의 발현에서의 감소 (녹다운으로서 지칭되기도 함), 또는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자의 발현의 녹아웃 및/또는 세포 내에서의 시클린 SDS 유사 단백질의 수량에서의 감소 또는 세포 내에서의 시클린 SDS 유사 단백질의 효소적 활성에서의 기능 감소 또는 기능 상실일 수 있다.

- [0024] "녹아웃" 또는 "전체 녹아웃"은 각각의 유전자의 발현이 더 이상 검출가능하지 않다는 것으로 이해해야 한다.
- [0025] "(효소적 활성에서의) 기능 상실"은 본 발명의 맥락에서, 상기 단백질이 상응하는 야생형 단백질과 동일하거나 또는 유사한 양으로 존재하긴 하지만, 그의 효과를 더 이상 유발하지 않는다는 것을 의미할 것이며, 돌연변이체 대립유전자가 이배체 식물에서 동형접합성 형태로 존재하는 경우에, 이러한 식물이 웅성 가임이지만, 수분 시씨없는 과실만을 생산한다. 용어 "비-기능적인" 및 "상실된 활성"은 "기능 상실"과 동일한 의미를 가질 것이다. 3가지 용어 모두가 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 따라서, 비-기능적인 단백질을 코딩하는 시클린 SDS 유사 유전자를 지칭하는 경우, 그러한 유전자는 발현될 수 있지만, 상기와 같이 코딩된 단백질이, 예를 들어, 야생형 SDS 유사 단백질과 비교하여 하나 이상의 아미노산 대체, 삽입 또는 결실을 포함하거나 또는 말단절단되기 때문에 기능적이 아니다.
- [0026] "(효소적 활성에서의) 기능의 감소" 또는 "저하된 기능"은 본 발명의 맥락에서, 상기 단백질이 상응하는 야생형 단백질과 동일하거나 또는 유사한 양으로 존재하긴 하지만, 그의 효과를 더 이상 유발하지 않는다는 것을 의미할 것이며, 즉 이배체 식물에서 동형접합성 형태로 존재하는 경우에, 이러한 식물이 웅성 가임이지만, 수분 시씨없는 과실만을 생산한다.
- [0027] "보존된 도메인"은 보존된 단백질 도메인, 예컨대 시클린\_N (pfam00134) 및 시클린\_C 도메인 (pfam02984)을 지칭한다. 이를 도메인은, 예를 들어 NCBI의 보존된 도메인 데이터베이스에서 찾을 수 있다 ([ncbi.nlm.nih.gov/cdd](http://ncbi.nlm.nih.gov/cdd) 하의 월드 와이드 웹).
- [0028] 본 발명의 맥락에서 "M1 세대" 또는 "M1 식물"은 돌연변이유발성 처리로부터 직접적으로 생산되는 제1 세대를 지칭할 것이다. 예를 들어, 돌연변이유발원으로 처리된 종자로부터 성장한 식물이 M1 세대를 대표한다.
- [0029] "M2 세대" 또는 "M2 식물"은 본원에서 M1 세대의 자가 수분으로부터 수득된 세대를 지칭할 것이다. 자가 수분된 M1 식물로부터 수득된 종자로부터 성장한 식물이 M2 식물을 나타낸다.
- [0030] 발현에서의 감소는, 예를 들어, 노던 블롯 분석 또는 RT-PCR을 사용하여, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 RNA 전사체의 수량을 측정함으로써 결정될 수 있다. 여기에서, 감소는 바람직하게는, 전사체의 양이 적어도 50%만큼, 특히 적어도 70%만큼, 바람직하게는 적어도 85%만큼 및 특히 바람직하게는 적어도 95%만큼 감소되는 것을 의미한다.
- [0031] 관련되는 식물 세포 또는 식물에서의 이를 단백질의 활성 저하를 초래하는, 시클린 SDS 유사 단백질의 양에서의 감소는, 예를 들어, 면역학적 방법, 예컨대 웨스턴 블롯 분석, ELISA (효소 결합 면역 흡착 검정) 또는 RIA (방사성 면역 검정)에 의해 결정될 수 있다. 여기서, 감소는 바람직하게는, 시클린 SDS 유사 단백질의 양이 적어도 50%만큼, 특히 적어도 70%만큼, 바람직하게는 적어도 85%만큼 및 특히 바람직하게는 적어도 95%만큼 감소하는 것을 의미한다.
- [0032] 지명된 단백질과 특이적으로 반응하는, 즉 상기 단백질과 특이적으로 결합하는 항체의 제작 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Lottspeich and Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4] 참조). 이러한 항체의 제작은 여러 회사에 의해 계약 서비스로서 제공된다.
- [0033] 본 발명과 관련하여, 본 발명에 따른 식물에서의 시클린 SDS 유사 단백질의 활성 감소는 또한, 식물 표현형에 의해 결정될 수 있다. 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하거나 또는 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 갖는 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 식물이 씨없는 과실을 생산하고 웅성 가임이다 (생육성 꽃가루를 생산함).
- [0034] 한 실시양태에서 시클린 SDS 유사 기능을 갖는 단백질의 감소된 활성은 상응하는 야생형 식물 세포 또는 야생형 식물과 비교하여 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물에서 감소된다.
- [0035] 본 발명의 맥락에서, 용어 "야생형 식물 세포" 또는 "야생형 식물"은 관련된 식물 세포 또는 식물이 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물의 생산을 위한 출발 재료로서 사용되었다는 것을 의미하며, 즉 도입된 (유전적) 변형 (들) 또는 돌연변이(들)와는 별도로, 그들의 유전적 정보가 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물의 것에 상응한다. 한 측면에서 야생형 식물 또는 야생형 식물 세포는 완전히 기능적인 시클린 SDS 유사 단백질을 포함하는 식물이며, 예를 들어 수박 식물 또는 식물 세포에 관해서는 서열식별번호(SEQ ID NO): 2의 단백질을 생산하고 자가 수분 시 씨있는 과실을 생산하는 이배체 수박 식물이다. 또는 멜론 식물 또는 세포에 관해서는 서열식별 번호: 6의 단백질을 생산하는 이배체 멜론 식물이거나, 또는 오이 식물 또는 세포에 관해서는 서열식별 번호: 12

의 단백질을 생산하는 이배체 오이 식물이거나, 또는 토마토 식물 또는 세포에 관해서는 서열식별번호: 19의 단백질을 생산하는 이배체 토마토 식물이거나, 또는 페퍼 식물 또는 세포에 관해서는 서열식별번호: 20의 단백질을 생산하는 이배체 식물이다.

[0036] 본 발명과 연계해서, 용어 "상응하는"이란 몇 가지 연구 대상의 비교에서, 서로 비교되는 관련 연구 대상이 동일한 조건 하에 유지되었다는 것을 의미한다. 본 발명과 연계해서, 야생형 식물 세포 또는 야생형 식물과 연계된 용어 "상응하는"이란 서로 비교되는 식물 세포 또는 식물이 동일한 재배 조건 하에 재배되었고, 이들이 동일한 (재배) 연령을 가지며, 도입된 (유전적) 변형(들) 또는 돌연변이(들)와는 별도로, 그들의 유전적 정보가 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물의 것에 상응한다는 것을 의미한다. RNA 및 DNA 분자의 핵산 서열이 서로 비교되거나 또는 서로 상응하는 것으로 언급되는 경우, DNA 분자 내의 티민 (T)이 RNA 분자 내의 우리딘 (U)과 등가라는 것이 관련 기술분야에서 널리 이해되고 있다. 따라서, 이러한 분자를 서로 비교하는 경우에는, DNA 서열 내의 T가 RNA 서열 내의 U에 의해 대체될 것이고, 그 반대의 경우도 가능하다는 것을 이해해야 한다.

[0037] 바람직하게는 본 발명에 따른 실시양태에서, 야생형 식물 세포, 식물 부분 또는 야생형 식물의 시클린 SDS 유사 단백질은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 분자에 의해 코딩된다:

[0038] a) 서열식별번호: 2 (수박 시클린 SDS 유사 단백질) 또는 서열식별번호: 6 (멜론 시클린 SDS 유사 단백질) 또는 서열식별번호: 12 (오이 시클린 SDS 유사 단백질) 또는 서열식별번호: 19 (솔라눔 리코페르시쿰(*Solanum lycopersicum*) 시클린 SDS 유사 단백질) 또는 서열식별번호: 20 (캅시쿰 안눔(*Capsicum annuum*) 시클린 SDS 유사 단백질) 하에 제공된 아미노산 서열을 수반한 단백질을 코딩하는 핵산 분자;

[0039] b) 단백질의 서열이 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 12 또는 서열식별번호: 19 또는 서열식별번호: 20 하에 제공된 아미노산 서열과의 적어도 58% 또는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90%, 또는 특히 바람직하게는 적어도 95%의 동일성을 갖는 것인 단백질을 코딩하는 핵산 분자;

[0040] c) 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 17 하에 제시된 뉴클레오티드 서열 또는 그의 상보적 서열을 포함하는 핵산 분자;

[0041] d) c) 하에 기재된 뉴클레오티드 서열과의 적어도 58% 또는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90% 또는 특히 바람직하게는 적어도 95%의 동일성을 갖는 핵산 분자;

[0042] e) 엄격한 조건 하에 a), b), c), 또는 d) 하에 기재된 핵산 분자의 적어도 하나의 가닥과 혼성화하는 핵산 분자;

[0043] f) 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열이 유전 코드의 변성으로 인해 a), b), c) 또는 d) 하에 확인된 핵산 분자의 서열로부터 벗어나는 것인 핵산 분자; 및

[0044] g) a), b), c) 또는 d) 하에 확인된 핵산 분자의 단편, 대립유전자성 변이체 및/또는 유도체를 나타내는 핵산 분자.

[0045] 서열식별번호: 1 하에 제시된 계놈 뉴클레오티드 서열, 및 서열식별번호: 1에 표시된 바와 같은 코딩 서열은 서열식별번호: 2 하에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 시트룰루스 라나투스(*Citrullus lanatus*) (수박)의 야생형 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩한다. 서열식별번호: 5는 서열식별번호: 6 하에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 쿠쿠미스 멜로(*Cucumis melo*) (멜론)로부터의 야생형 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 코딩 서열을 제시한다. 서열식별번호: 12는 쿠쿠미스 사티부스(*Cucumis sativus*) (오이)로부터의 야생형 시클린 SDS 유사 단백질을 제시한다. 서열식별번호: 19는 솔라눔 리코페르시쿰 (토마토)의 야생형 시클린 SDS 유사 단백질을 제시한다. 서열식별번호: 20은 캡시쿰 안눔 (페퍼)의 야생형 시클린 SDS 유사 단백질을 제시한다.

[0046] 본 발명에 따른 식물 세포, 식물 부분 또는 식물은 임의의 종으로부터의 식물 세포 또는 임의의 종의 식물일 수 있다. 본 발명에 따른 식물 세포는 단자엽 및 쌍자엽 식물 세포일 수 있고, 본 발명에 따른 식물은 단자엽 식물 및 쌍자엽 식물일 수 있다. 바람직하게는 본 발명에 따른 식물 세포는 채소류의 식물 세포 (채소 식물 세포)이거나 또는 상기 식물은 채소 식물, 특히 토마토, 양파, 부추, 마늘, 당근, 페퍼, 아스파라거스, 아티초크, 셀러리악, 오이, 멜론, 조롱박, 호박, 상추, 수박, 시금치, 양배추 (브라시카 올레라세아(*Brassica oleracea*)), 콘 샐러드, 가지 및 오크라와 같은 채소류이다. 보다 바람직한 것은 쿠쿠르비타세아에 (*Cucurbitaceae*) 과 또는 솔라나세아에 (*Solanaceae*) 과로부터의 채소 식물 또는 채소류로부터의 식물 세포 (채

소 식물 세포)이다. 본 발명에 따른 가장 바람직한 식물 세포 및 식물은 호박 (куку르비타 페포(*Cucurbita pepo*), 쿠쿠르비타 맥시마(*Cucurbita maxima*), 쿠쿠르비타 모스카타(*Cucurbita moschata*), 라게나리아 시세라리아(*Lagenaria siceraria*)), 멜론 (кукумис 멜로), 오이 (кукумис 사티부스), 수박 (시트룰루스 라나투스), 토마토 (솔라눔 리코페르시쿰) 또는 페퍼 (캅시쿰 안눔) 식물 세포 또는 식물을 포함하고, 특히 바람직한 것은 수박 (시트룰루스 라나투스) 또는 멜론 (кукумис 멜로)으로부터의 식물 세포 또는 수박 (시트룰루스 라나투스) 또는 멜론 (кукумис 멜로) 식물이다. 한 실시양태에서 상기 식물 및 식물 세포는 이들 종, 예컨대 우수한 작물 식물 특징을 가지며, 특히 우수한 품질 및 균일성의 시장성있는 산물 (예를 들어 과실)을 생산하는 근친 교배 계통 또는 품종의 재배된 식물이다.

[0047] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본 발명에 따른 식물 세포를 포함하는 식물 및 식물 부분에 관한 것이다.

[0048] 본 발명의 추가 실시양태는 상응하는 야생형 식물 세포 또는 야생형 식물과 비교하여 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 식물 세포 또는 식물이며, 여기서 상응하는 야생형 식물 세포 또는 야생형 식물의 시클린 SDS 유사 단백질이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산 분자에 의해 코딩된다:

[0049] a) 서열식별번호: 2 (수박 시클린 SDS 유사 단백질) 또는 서열식별번호: 6 (멜론 시클린 SDS 유사 단백질) 또는 서열식별번호: 12 (오이 시클린 SDS 유사 단백질) 또는 서열식별번호: 19 (솔라눔 리코페르시쿰 시클린 SDS 유사 단백질) 또는 서열식별번호: 20 (캅시쿰 안눔 시클린 SDS 유사 단백질) 하에 제공된 아미노산 서열을 수반한 단백질을 코딩하는 핵산 분자;

[0050] b) 단백질의 서열이 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 12 또는 서열식별번호: 19 또는 서열식별번호: 20 하에 제공된 아미노산 서열과의 적어도 58% 또는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90% 또는 특히 바람직하게는 적어도 95%의 동일성을 갖는 것인 단백질을 코딩하는 핵산 분자;

[0051] c) 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 17 하에 제시된 뉴클레오티드 서열 또는 그의 상보적 서열을 포함하는 핵산 분자;

[0052] d) c) 하에 기재된 뉴클레오티드 서열과의 적어도 58% 또는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90% 또는 특히 바람직하게는 적어도 95%의 동일성을 갖는 핵산 분자;

[0053] e) 엄격한 조건 하에 a), b), c), 또는 d) 하에 기재된 핵산 분자의 적어도 하나의 가닥과 혼성화하는 핵산 분자;

[0054] f) 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열이 유전 코드의 변성으로 인해 a), b), c) 또는 d) 하에 확인된 핵산 분자의 서열로부터 벗어나는 것인 핵산 분자; 및

[0055] g) a), b), c) 또는 d) 하에 확인된 핵산 분자의 단편, 대립유전자성 변이체 및/또는 유도체를 나타내는 핵산 분자.

[0056] "서열 동일성" 및 "서열 유사성"은 포괄적인 또는 국소적인 정렬 알고리즘을 사용하여 두 펩티드 또는 두 뉴클레오티드 서열을 정렬시킴으로써 결정될 수 있다. 이들 서열이, 예를 들어 프로그램 GAP 또는 BESTFIT 또는 엔보스(Emboss) 프로그램 "니들(Needle)" (디폴트 파라미터를 사용함; 하기 참조)에 의해 최적으로 정렬되고 적어도 특정의 최소 백분율의 서열 동일성 (하기에 추가로 정의되는 바와 같음)을 공유하는 경우에, 이들 서열은 "실질적으로 동일한" 또는 "상당한 동일성"으로서 지칭될 수 있다. 이들 프로그램은 두 서열을 그들의 전체 길이에 걸쳐 정렬하고, 매칭물의 수를 최대화하며 갭의 수를 최소화하기 위하여 니들만 앤 분쉬(Needleman and Wunsch)의 포괄적인 정렬 알고리즘을 사용한다. 일반적으로, 디폴트 파라미터를 사용하면, 갭 창출 폐널티는 10이고 갭 연장 폐널티는 0.5이다 (둘 다 뉴클레오티드 및 단백질 정렬을 위함). 뉴클레오티드의 경우, 사용된 디폴트 스코어링 매트릭스는 DNAFULL이고, 단백질의 경우 디폴트 스코어링 매트릭스는 블로섬(Blosum)62이다 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 10915-10919). 백분율 서열 동일성에 대한 서열 정렬 및 스코어는, 예를 들어, 컴퓨터 프로그램, 예컨대 [ebi.ac.uk/Tools/emboss/](http://ebi.ac.uk/Tools/emboss/) 하의 월드 와이드 웹으로 접근가능한 EMBOSS를 사용하여 결정될 수 있다. 또 다른 한편으론 서열 유사성 또는 동일성은 통상적으로 공지된 알고리즘 및 출력 포맷, 예컨대 FASTA, BLAST 등을 사용함으로써 데이터베이스 (예를 들어 EMBL, 진뱅크(GenBank))에 대항하여 검색 함으로써 결정될 수 있지만, 표적물은 서열 동일성을 비교하기 위해 쌍을 이루어 검색 및 정렬되어야 한다. 백분율 서열 동일성이 적어도 58%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 그 초과인 경우 (핵산의 경우에는 스코어링 매트릭스 DNAFULL을 사용하고 단백질의 경우에는 블로섬62를 사용하여, 디폴트 파라미터, 즉 갭 창출

페널티 = 10, 갭 연장 페널티 = 0.5를 이용하는 엠보스 "니들"에 의해 결정된 바와 같음), 두 단백질 또는 두 단백질 도메인, 또는 두 핵산 서열은 "상당한 서열 동일성"을 갖는다. 이러한 서열은 또한, 본원에서 "변이체" 또는 "대립유전자성 변이체" 또는 "유도체"로서 지칭된다. 본원에 개시된 특이적 핵산 및 단백질 서열 외에 시클린 SDS 유사 단백질 및 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자/대립유전자의 다른 대립유전자성 변이체가 확인될 수 있다. 따라서, 예를 들어 서열식별번호: 2의 단백질, 또는 서열식별번호: 6의 단백질, 또는 서열식별번호: 12의 단백질, 또는 서열식별번호: 18의 단백질, 또는 서열식별번호: 19의 단백질과의 상당한 서열 동일성을 갖는 시클린 SDS 유사 단백질이 상기 제공된 단백질의 변이체이다.

[0057]

대립유전자성 변이체는 다른 재배된 채소 식물 세포 또는 식물, 특히 토마토, 양파, 부추, 마늘, 당근, 페퍼, 아스파라거스, 아티초크, 조롱박, 호박, 셀러리악, 오이, 멜론, 상추, 수박, 시금치, 양배추 (브라시카 (*Brassica*)) 종, 콘 셀러드 및 오크라와 같은 채소류에 존재할 수 있다. 이러한 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 대립유전자성 변이체에서의 돌연변이는 다른 채소 식물 내에서의 웅성 및 자성 가임성 및 씨없는 과실 생산에 대하여 동일한 효과를 갖는다. 특히 시클린 SDS 유사 유전자의 대립유전자성 변이체는 멜론 (쿠쿠미스 멜로), 오이 (쿠쿠미스 사티부스), 수박 (시트룰루스 라나투스), 호박 (쿠쿠르비타 페포, 쿠쿠르비타 맥시마, 쿠쿠르비타 모스카타, 라게나리아 시세라리아)과 같은 쿠쿠르비타세아에 과로부터의 식물 세포 또는 식물에 존재할 수 있으며, 시클린 SDS 유사 유전자의 특히 바람직한 대립유전자성 변이체는 수박 (시트룰루스 라나투스), 멜론 (쿠쿠미스 멜로) 또는 오이 (쿠쿠미스 사티부스) 또는 수박 (시트룰루스 라나투스) 또는 멜론 (쿠쿠미스 멜로) 또는 오이 (쿠쿠미스 사티부스) 식물의 식물 세포에 존재할 수 있다. 부가적으로 시클린 SDS 유사 유전자의 대립유전자성 변이체는 또한, 토마토 (솔라눔 리코페르시쿰) 또는 토마토의 야생 연관식물 (에스. 펌피넬리 (*S. pimpinelli*), 에스. 케에스마니아에 (*S. cheesmaniae*), 에스. 갈라파겐세 (*S. galapagense*), 에스. 펌피넬리풀름 (*S. pimpinellifolium*), 에스. 크미엘레브스키이 (*S. chmielewskii*), 에스. 하브로카이테스 (*S. habrochaites*), 에스. 네오리키이 (*S. neorickii*), 및 에스. 펜넬리 (*S. pennelli*), 에스. 아르카눔 (*S. arcanum*), 에스. 퀸렌세 (*S. chilense*), 에스. 코르넬리오뮬레리 (*S. corneliomulleri*), 에스. 후아일라센세 (*S. huaylasense*), 및 에스. 페루비아눔 (*S. peruvianum*)), 페퍼 (캡시쿰 안눔), 솔라눔 멜론게나 (*Solanum melongena*) (가지), 솔라눔 투베로숨 (*Solanum tuberosum*) (감자) 등과 같은 솔라나세아에 과로부터의 식물 세포 또는 식물에 존재할 수 있다.

[0058]

대립유전자성 변이체는 또한, 다른 재배된 작물 식물, 예컨대 밭 작물 (예를 들어 브라시카 종, 옥수수, 벼, 대두, 밀, 보리, 목화, 담배, 커피 등) 또는 과일 작물 (예를 들어 포도, 사과, 자두, 감귤류, 딸기 등)에 존재할 수 있다.

[0059]

куку르비та세아의 시클린 SDS 유사 단백질이 서로 높은 서열 동일성을 가지며 (제공된 서열에 대하여 적어도 70%), 솔라나세아의 시클린 SDS 유사 단백질 또한 서로 높은 서열 동일성을 갖는 것으로 인지된다. 다른 한편으로는, 쿠쿠르비타세아에 서열과 솔라나세아에 서열 간의 서열 동일성을 높지 않다 (40% 이하) (하기 표 A 참조).

[0060] 표 A - 시클린 SDS 유사 단백질 서열 동일성 (니들만 앤 분쉬를 이용한 쌍을 이룬 정렬)

	수박 (SEQ ID NO 2)	멜론 (SEQ ID NO 6)	오이 (SEQ ID NO 12)	토마토 (SEQ ID NO 19)	페퍼 (SEQ ID NO 20)
수박 (SEQ ID NO 2)	100%	73%	70%	34%	32%
멜론 (SEQ ID NO 6)		100%	86%	40%	38%
오이 (SEQ ID NO 12)			100%	40%	37%
토마토 (SEQ ID NO 19)				100%	81%
페퍼 (SEQ ID NO 20)					100%

[0061]

[0062]

"엄격한 혼성화 조건"은 소정의 뉴클레오티드 서열과 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 엄격한 조건은 서열 의존적이고, 상이한 상황 하에 상이할 것이다. 일반적으로, 엄격한 조건은 규정된 이온 강도 및 pH 하에서 특이적 서열에 대한 열 용점 ( $T_m$ )보다 약 5°C 더 낮도록 선택된다.  $T_m$ 은 표적 서열의 50%가 완벽하게 매칭된 프로브와 혼성화하는 온도이다 (규정된 이온 강도 및 pH 하에). 전형적으로 염 농도가 pH 7에서 약 0.02몰이고 온도가 적어도 60°C인 엄격한 조건이 선택될 것이다. 염 농도를 낮추고/낮추거나 온도를 상승시키는 것이 염격도를 증가시킨다. RNA-DNA 혼성화 (예를 들어 100nt의 프로브를 이용한 노던 블롯)에 대한 엄격한 조건은, 예를 들어, 63°C 하에 20분 동안 0.2X SSC에서 적어도 1회 세척하는 것을 포함하는 조건, 또는 등가의 조건이다. DNA-DNA 혼성화 (예를 들어 100nt의 프로브를 이용한 서던 블롯)에 대한 엄격한 조건은, 예를 들어, 적어도 50°C, 통상적으로 약 55°C의 온도 하에 20분 동안 0.2X SSC에서 적어도 1회 (통상적으로 2회) 세척하는 것을 포함하는 조건, 또는 등가의 조건이다. 또한 문헌 [Sambrook et al. (1989) and Sambrook and Russell (2001)] 참조.

[0063]

본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물에서의 시클린 SDS 유사 단백질의 활성에서의 감소는 또한, 유전자 침묵 효과에 의해 달성될 수 있다.

[0064]

본 발명의 추가 실시양태에서 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물에서의 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성은 유전자 침묵 효과에 의해 유발된다.

[0065]

시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 갖는 본 발명에 따른 식물 세포 및 본 발명에 따른 식물은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 유전자 침묵 효과를 유발하는 상이한 방법에 의해 생산될 수 있다. 이는, 예를 들어, 상응하는 안티센스 RNA 또는 이중 가닥 RNA 구축물의 발현 (RNAi 기술); 공동-억제 효과를 부여하는 핵산 분자 또는 벡터의 제공; 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 특이적 전사체를 분할하는 상응하게 구축된 리보자임의 발현을 포함한다.

[0066]

본 발명에 따른 식물 세포 및 식물에서의 시클린 SDS 유사 단백질 활성의 감소는 각각의 식물 세포 또는 식물에서 안티센스 서열을 발현시킴으로써 야기될 수 있다.

[0067]

본 발명에 따른 식물 세포 및 식물에서의 시클린 SDS 유사 단백질 활성의 감소는 억제될 각각의 표적 유전자, 바람직하게는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자 또는 대립유전자의 센스 및 안티센스 RNA 분자의 동시 발현 (RNAi 기술)에 의해 야기될 수 있다.

[0068]

이 외에도, 식물체에서는 프로모터 서열의 이중 가닥 RNA 분자의 형성이 이러한 프로모터의 상동 카피의 메틸화 및 전사 불활성화를 트랜스로 유발할 수 있는 것으로 공지되어 있다 (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). 본 발명에 따른 식물 세포 및 식물에서의 시클린 SDS 유사 단백질 활성의 감소는 억제될 각각의

표적 유전자, 바람직하게는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자 또는 대립유전자의 전사를 개시하는 프로모터 서열의 센스 및 안티센스 RNA 분자의 동시 발현 (RNAi 기술)에 의해 야기될 수 있다.

[0069] 리보자임은 또한, RNA 분자 코딩 표적 유전자를 절단시킴으로써 단백질의 발현을 감소시키는 것으로 관련 기술 분야에 기재되어 있다.

[0070] 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 각각의 유전자 침묵 기술에 관한 부가의 논의가 하기 본원에 추가로 제공될 것이므로, 이는 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물에 적용가능하다.

[0071] "유전자 침묵 효과"는 표적 유전자 또는 유전자 계열의 유전자 발현의 하향 조절 또는 완전한 억제를 지칭한다. 침묵된 식물 세포 또는 식물은 상응하는 야생형 식물 세포 또는 상응하는 야생형 식물과 비교하여, 각각의 표적 유전자 또는 대립유전자에 대한 더 적은 양의 번역 적격 전사체 (mRNA 포함)를 생산한다. 더 적은 양의 번역 적격 전사체 (mRNA 포함)는 각각의 전사체의 표적화된 분해에 기인될 수 있다.

[0072] "표적 유전자 또는 대립유전자"는 유기체 (예를 들어 식물 세포 또는 식물)가 목적하는 표현형을 생산하도록 조정되어야 하는 유전자 또는 대립유전자 또는 유전자 계열 (또는 유전자의 하나 이상의 특이적 대립유전자)인 것으로 이해되어야 한다. 웅성 불임 씨없는 과실 생산 식물과 관련하여, 예를 들어 표적 유전자(들) 또는 표적 대립유전자(들)는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자(들)이다.

[0073] 본 발명의 추가 실시양태에서 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물에서의 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성은 면역조정 방법에 의해 야기된다.

[0074] 식물 세포 또는 식물 내의 단백질의 효소적 활성을 저하시키는 추가의 가능한 방식은 소위 면역조정 방법이다. 식물체에서는 식물 단백질을 특이적으로 인식하는 항체의 발현이, 관련되는 단백질의 활성의 감소를 초래하는 것으로 공지되어 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 각각의 기술에 관한 부가의 논의가 하기 본원에 추가로 제공될 것이다.

[0075] 본 발명의 추가 실시양태는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 식물 세포 또는 식물이다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 동형 접합성 또는 이형접합성 상태로 존재할 수 있다. 한 측면에서, 돌연변이체 대립유전자는 이로써 코딩된 돌연변이체 단백질의 감소된 기능을 갖거나 또는 기능 상실된 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩한다. 돌연변이체 대립유전자는 하나 이상의 아미노산이 대체, 삽입 또는 결실된 단백질을 코딩할 수 있어, 야생형 (기능적인) 단백질과 비교하여 감소된 기능을 갖거나 또는 기능 상실된 단백질이 초래될 수 있다. 한 측면에서 돌연변이체 대립유전자는 말단절단된 시클린 SDS 유사 단백질의 생산을 초래하며, 말단절단된 단백질은 감소된 기능을 갖거나 또는 기능 상실된다. 또 다른 측면에서 돌연변이체 대립유전자는 시클린 SDS 유사 단백질의 보존된 도메인, 예컨대 시클린\_N 도메인 (pfam00134) 또는 시클린\_C 도메인 (pfam02984)에서 대체되거나, 삽입되거나 또는 결실된 하나 이상의 아미노산을 수반한 단백질을 코딩한다. 특정 단백질의 시클린\_N 도메인 및 시클린\_C 도메인은, 예를 들어, NCBI의 웹사이트 ([blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) 하의 월드 와이드 웹) 상에서 단백질 BLAST에 대항한 단백질에 의해 또는 NCBI의 보존된 도메인 데이터베이스 ([ncbi.nlm.nih.gov/cdd](http://ncbi.nlm.nih.gov/cdd) 하의 월드 와이드 웹)에서 검색함으로써 통상의 기술자에 의해 확인될 수 있다.

[0076] 서열식별번호: 2에서 시클린\_N 도메인은 아미노산 388 내지 아미노산 463의 범위이고 시클린\_C 도메인은 아미노산 466 내지 531의 범위이다.

[0077] 단백질 대 단백질 BLAST는 사용된 검색 질의의 시클린\_N 및 시클린\_C 도메인을 제공하며, 이는 상기 도메인을 수반한 상기 질의된 서열의 정렬을 포함한다. 특정 수 내지 또 다른 수는 종말점을 포함하며, 즉 언급된 첫 번째 수와 마지막 수를 포함하는 것으로 인지된다. 따라서, 본원에 제공된 단백질 서열 중 임의의 것에 대하여, 또는 다른 변이체 서열에 대하여 (예를 들어, 본원에 제공된 단백질 서열, 예를 들어 서열식별번호: 2, 6, 12, 19 또는 20 중 임의의 것과의 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과의 서열 동일성을 포함하는 단백질), 시클린\_N 및 시클린\_C 도메인이 결정될 수 있다.

[0078] 서열식별번호: 6에서 시클린\_N 도메인은 아미노산 351 내지 아미노산 481의 범위이고 시클린\_C 도메인은 아미노산 486 내지 아미노산 577의 범위이다.

[0079] 서열식별번호: 12에서 시클린\_N 도메인은 아미노산 343 내지 아미노산 473의 범위이고 시클린\_C 도메인은 아미노산 478 내지 아미노산 569의 범위이다.

[0080] 서열식별번호: 19에서 시클린\_N 도메인은 아미노산 362 내지 아미노산 494의 범위이고 시클린\_C 도메인은 아미

노산 499 내지 584의 범위이다.

[0081] 서열식별번호: 20에서 시클린\_N 도메인은 아미노산 332 내지 아미노산 464의 범위이고 시클린\_C 도메인은 아미노산 469 내지 554의 범위이다.

[0082] 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자가 이형접합성 상태로 존재하는 식물은 종자를 생산할 것이고 웅성 가임이다. 따라서, 이들 식물을 사용하여 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 다른 식물 내로 도입할 수 있거나 또는 이들 식물을 사용하여 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자가 존재하는 식물 내로 추가의 형질을 도입할 수 있다. 이들 식물을 또한 사용하여 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 식물을 번식시킬 수 있다. 각각의 경우에 자가 수분된 자손의 50%가 여전히 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 이형접합성 상태로 수반할 것이다. 따라서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자가 존재하는 식물이, 예를 들어 육종에 유용하다.

[0083] 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성인 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물에 관한 것이다.

[0084] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물에서의 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 식물 세포 또는 식물 각각에 존재하는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 기인하거나 또는 이러한 돌연변이체 대립유전자에 의해 유발되거나 또는 그러한 돌연변이체 대립유전자의 효과이다.

[0085] 한 측면에서, 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물은 시클린 SDS 유사 단백질의 기능 감소 또는 시클린 SDS 유사 단백질의 기능 상실을 코딩하는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성이다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 본 발명에 따른 식물은 자신의 꽃가루 또는 상이한 식물로부터 (예를 들어 야생형 식물로부터) 수득된 꽃가루와의 수분 시씨없는 과실을 생산한다.

[0086] 따라서 본 발명의 또 다른 실시양태는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물에 관한 것이다.

[0087] 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 식물이 웅성 가임이 되도록 하지만, 이러한 식물이 상기 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 경우에는 씨없는 과실을 생산하도록 한다. 본 발명의 실시양태와 관련하여, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에서의 돌연변이는 결실, 말단절단, 삽입, 점 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 미스센스 또는 비-동의 돌연변이, 스플라이스-부위 돌연변이, 프레임 시프트 돌연변이 및/또는 조절 서열 내의 돌연변이를 포함한 임의의 돌연변이일 수 있다. 바람직하게는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에서의 돌연변이는 점 돌연변이 및/또는 스플라이스-부위 돌연변이이다. 이러한 돌연변이는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 코딩 서열을 포함하는 DNA 서열에서 일어나거나 또는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 RNA 서열에서 일어나거나 또는 시클린 SDS 유사 단백질의 아미노산에서 일어날 수 있다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 DNA 서열과 관련하여, 돌연변이는 코딩 서열 (cds; 엑손으로 구성됨)에서 일어날 수 있거나 또는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 비-코딩 서열, 예컨대 5'- 및 3'-비변역 영역, 인트론, 프로모터, 인핸서 등에서 일어날 수 있다. 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 RNA와 관련하여, 돌연변이는 프리-mRNA 또는 mRNA에서 일어날 수 있다. 한 측면에서 돌연변이체 대립유전자는, 예를 들어 보존된 시클린\_N 및/또는 시클린\_C 도메인에서 대체, 삽입 또는 결실되는 하나 이상의 아미노산을 초래하는, 대체, 삽입 및/또는 결실되는 하나 이상의 아미노산으로 인해 기능 상실 또는 기능 감소를 나타내는 단백질을 초래한다. 예를 들어, 시클린\_C 도메인, 또는 그의 부분, 또는 시클린\_N 도메인 및 시클린\_C 도메인, 또는 시클린\_N 도메인 및 시클린\_C 도메인의 부분의 결실을 유발하도록 상기 단백질을 말단절단하면 이러한 단백질의 기능 상실 또는 기능 감소가 초래될 것이다.

[0088] 따라서 본 발명의 추가 실시양태는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물에 관한 것이며, 상기 돌연변이체 대립유전자가 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이 중 하나 이상을 포함하거나 또는 그를 일으키는 것을 특징으로 한다:

[0089] a) 계놈 서열에서의 결실, 말단절단, 삽입, 점 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 미스센스 또는 비-동의 돌연변이, 스플라이스-부위 돌연변이, 프레임 시프트 돌연변이;

- [0090] b) 하나 이상의 조절 서열에서의 돌연변이;
- [0091] c) 코딩 서열에서의 결실, 말단절단, 삽입, 점 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 미스센스 또는 비-동의 돌연변이, 스플라이스-부위 돌연변이, 프레임 시프트 돌연변이;
- [0092] d) 프리-mRNA 또는 mRNA에서의 결실, 말단절단, 삽입, 점 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 미스센스 또는 비-동의 돌연변이, 스플라이스-부위 돌연변이, 프레임 시프트 돌연변이; 및/또는
- [0093] e) 시클린 SDS 유사 단백질의 하나 이상의 아미노산에서의 결실, 말단절단, 삽입 또는 대체.

[0094] 서열식별번호: 1과 비교하여, 한 실시양태로서 (EMB1 돌연변이체 수박 식물에 존재함) 본원에 개시된 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자 중 하나는 서열식별번호: 1 내의 뉴클레오티드 위치 2185에 점 돌연변이 (G를 A에 의해 대체함)를 갖는다. 상기 개시된 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA가 서열식별번호: 3 하에 제시된다. 서열식별번호: 1 하에 제시된 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 야생형 대립유전자의 위치 2186 내지 2201에서의 상응하는 뉴클레오티드는 서열식별번호: 3 하에 제시된 mRNA에 존재하지 않는다. 따라서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에서 발견된 점 돌연변이는 상응하는 야생형 대립유전자로부터 전사된 mRNA와 비교하여 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA 내의 16개 뉴클레오티드의 결실을 유발한다. 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA에서의 결실은 각각의 mRNA의 교대 스플라이싱을 초래하는 스플라이스 부위의 돌연변이에 의해 설명된다. 또한, 상기 개시된 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA 내의 16개 뉴클레오티드의 결실은 상응하는 야생형 대립유전자로부터 전사된 mRNA와 비교하여 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA의 리딩 프레임에서의 프레임 시프트를 유발한다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 야생형 대립유전자로부터 변역된 단백질은 서열식별번호: 2 하에 제시된다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자로부터 변역된 단백질은 서열식별번호: 4 하에 제시된다. 서열식별번호: 2 내의 아미노산 358 내지 363 (Ile-Leu-Arg-Phe-Glu-Glu)을 코딩하는 상응하는 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 4가 존재하지 않고, 리딩 프레임에서의 프레임 시프트로 인해 나머지 아미노산 서열이 상이하며, 서열식별번호: 2 내의 아미노산 364 내지 562가 서열식별번호: 4 내의 8개의 일탈적인 아미노산 Asn-Trp-Thr-Met-Lys-Lys-Pro-Ile (즉, 서열식별번호: 4의 아미노산 358 내지 365)에 의해 대체된다. 돌연변이체 시클린 SDS 유사 단백질은 562개 아미노산의 야생형 단백질과 비교하여 훨씬 더 짧은, 단지 365개 아미노산이다. 따라서, 서열식별번호: 4 하에 제시된 바와 같은 돌연변이체 시클린 SDS 유사 단백질의 아미노산 서열은 서열식별번호: 2 하에 제시된 야생형 시클린 SDS 유사 단백질과 비교하여 아미노산 결실 및 아미노산 대체를 포함한다. 더욱이, SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA의 리딩 프레임에서의 프레임 시프트는 조기 정지 코돈 (서열식별번호: 3 내의 뉴클레오티드 1096 내지 1098)을 창출하는 넌센스 돌연변이를 유발하여, 서열식별번호: 2 하에 제시된 야생형 대립유전자에 의해 코딩된 상응하는 아미노산 서열과 비교한 경우에 C-말단에서의 197개 아미노산이 말단절단되는 돌연변이체 대립유전자에 의해 코딩된 아미노산 서열이 초래된다. 따라서, 야생형 단백질과 비교하여, 야생형 C-말단의 205개 아미노산이 프레임 시프트로 인해 C-말단 끝에서 8개의 상이한 (일탈적인) 아미노산에 의해 대체되어, 야생형 단백질보다 197개 아미노산이 더 짧은 돌연변이체 단백질이 생성된다. 따라서, 이러한 돌연변이체 단백질은 야생형 단백질과 비교하여 말단절단되며, 이는 야생형 C-말단의 205개 아미노산이 돌연변이체 단백질에서 누락되었기 때문이다. 야생형 단백질 중에서 엑손 1의 아미노산 (서열식별번호: 2의 아미노산 1 내지 357) 만이 여전히 돌연변이체 단백질에 존재한다. 이는 또한 보존된 단백질 도메인 시클린\_N 및 시클린\_C가 존재하지 않는다는 것을 의미하며, 이는 돌연변이체 단백질이 기능이 없거나 (즉, 돌연변이체 대립유전자는 기능 상실 대립유전자임) 또는 기능 감소를 나타낸다는 것을 의미한다.

[0095] 요약하면, 본 출원을 예시하기 위해 본원에 구체적으로 개시된 것은 한 측면에서, 상응하는 야생형 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 핵산 서열과 비교하여 점 돌연변이 (뉴클레오티드 대체)를 갖는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 핵산 서열이다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에서의 점 돌연변이는 스플라이스-부위 돌연변이를 유발하여, 각각의 프리-mRNA의 교대 스플라이싱을 초래한다. 이러한 교대 스플라이싱은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA의 오픈 리딩 프레임에서의 프레임 시프트를 유발한다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA의 오픈 리딩 프레임에서의 프레임 시프트는 상응하는 야생형 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자로부터 전사된 mRNA와 비교하여, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA에서 조기 정지 코돈을 창출시키는 넌센스 돌연변이의 창출, 뉴클레오티드의 결실 및 뉴클레오티드의 대체 (미스센스 또는 비-동의 돌연변이)를 유발한다. 돌연변이체 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자로부터 전사된 mRNA로부터 변역된 단백질의 각각의 아미노산 서열은 상응하는 야생형 시클린

SDS 유사 단백질 코딩 유전자로부터 전사된 mRNA로부터 번역된 아미노산 서열과 비교하여 아미노산의 결실, 아미노산의 대체 및 C-말단에서의 아미노산 서열의 말단절단을 나타낸다. 점 돌연변이가 첫 번째 인트론에 있기 때문에, 야생형 시클린 SDS 유사 단백질의 엑손 2, 엑손 3 및 엑손 4에 의해 코딩된 아미노산이 돌연변이체에서는 누락되며, 즉 야생형 SDS 유사 단백질의 엑손 1에 의해 코딩된 아미노산만이 돌연변이체 단백질에 존재한다.

[0096] 수박에서는 시클린 SDS 유사 단백질의 엑손 1이 서열식별번호: 2의 아미노산 1 내지 357을 코딩하고; 멜론에서는 시클린 SDS 유사 단백질의 엑손 1이 서열식별번호: 6 내의 아미노산 1 내지 338을 코딩하며; 오이에서는 시클린 SDS 유사 단백질의 엑손 1이 서열식별번호: 12 내의 아미노산 1 내지 330을 코딩하고; 토마토에서는 시클린 SDS 유사 단백질의 엑손 1이 서열식별번호: 19 내의 아미노산 1 내지 350을 코딩하며; 페퍼에서는 시클린 SDS 유사 단백질의 엑손 1이 서열식별번호: 20 내의 아미노산 1 내지 320을 코딩한다.

[0097] 상기 본원 (및 실시예)에 기재된 수박 EMB1 돌연변이체 식물 외에도, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자에서의 상이한 돌연변이를 포함하는 또 다른 수박 식물이 돌연변이유발에 의해 생성되었다. 이러한 돌연변이체는 서열식별번호: 1의 뉴클레오티드 1687에서의 C (시토신)가 T (티민) 뉴클레오티드로 치환된 것을 포함하며, 이로써 코돈 'cag' (야생형 단백질의 아미노산 224인 아미노산 글루타민에서 종결됨)가 정지 코돈인 'tag'로 변화된다. 돌연변이체 cDNA가 서열식별번호: 17에 제시되고, 엑손 1에 의해 코딩된 아미노산의 부분 (즉, 아미노산 1 내지 357 대신 아미노산 1 내지 223) 만을 포함하는 말단절단된 단백질이 서열식별번호: 18에 제시된다. EMB1 돌연변이체 식물에서와 같이, 2개의 보존된 도메인, 즉 시클린\_N 및 시클린\_C 도메인이 돌연변이체 단백질에서 누락되었다. 또한 이러한 돌연변이체는 시클린 SDS 유사 단백질의 기능 상실 (또는 적어도 기능 감소)을 초래한다.

[0098] 본 발명의 한 측면에서 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 시클린\_N 및/또는 시클린\_C 도메인을 코딩하는 아미노산 중 하나 이상 또는 전부가 결실되거나 또는 야생형에서와 상이한 아미노산에 의해 대체되는 돌연변이를 갖는다. 한 측면에서 돌연변이체 대립유전자는 시클린\_N 도메인의 전부 또는 일부 및/또는 시클린\_C 도메인의 전부 또는 일부가 결여된 말단절단된 단백질을 초래한다. 예를 들어, 돌연변이체 대립유전자는 조기 정지 코돈을 초래하는 돌연변이를 함유함으로써, 시클린\_N 도메인의 전부 또는 일부 및/또는 시클린\_C 도메인의 전부 또는 일부가, 이로써 생성된 단백질에 더 이상 존재하지 않는다.

[0099] 한 측면에서 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 1의 수박 시클린 SDS 유사 유전자의 돌연변이체 대립유전자이고, 서열식별번호: 4의 단백질 또는 서열식별번호: 18의 단백질을 초래한다.

[0100] 본 발명의 한 측면에서 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 야생형 단백질의 엑손 2, 3 및/또는 4를 코딩하는 아미노산이 부재하도록 하는 돌연변이를 갖는다. 따라서 한 측면에서 돌연변이체 대립유전자는 말단절단된 시클린 SDS 유사 단백질 / 또는 야생형 단백질의 엑손 2, 3 및/또는 4에 의해 코딩된 아미노산이 결여되는 결실을 포함하는, 즉 서열식별번호: 2의 아미노산 358 내지 413 (엑손 2) 또는 서열식별번호: 6의 아미노산 339 내지 394 (엑손 2), 서열식별번호: 12의 아미노산 331 내지 386 (엑손 2), 서열식별번호: 19의 아미노산 351 내지 407 (엑손 2), 서열식별번호: 20의 아미노산 321 내지 377 (엑손 2), 및/또는 서열식별번호: 2의 아미노산 414 내지 469 (엑손 3) 또는 서열식별번호: 6의 아미노산 395 내지 493 (엑손 3) 또는 서열식별번호: 12의 아미노산 387 내지 485, 서열식별번호: 19의 아미노산 408 내지 506 (엑손 3), 서열식별번호: 20의 아미노산 378 내지 476 (엑손 3), 및/또는 서열식별번호: 2의 아미노산 470 내지 562 (엑손 4) 또는 서열식별번호: 6의 아미노산 494 내지 577 (엑손 4) 또는 서열식별번호: 12의 아미노산 486 내지 569 (엑손 4), 서열식별번호: 19의 아미노산 507 내지 590 (엑손 4), 서열식별번호: 20의 아미노산 477 내지 560 (엑손 4)이 결여되는 단백질을 코딩한다. 임의로 돌연변이체 대립유전자는 말단절단된 시클린 SDS 유사 단백질 / 또는 엑손 1을 코딩하는 아미노산의 전부 또는 일부, 즉 서열식별번호: 2의 아미노산 1 내지 357 또는 서열식별번호: 6 내의 아미노산 1 내지 338 또는 서열식별번호: 12 내의 아미노산 1 내지 330 또는 서열식별번호: 19의 아미노산 1 내지 350, 또는 서열식별번호: 20의 아미노산 1 내지 320이 추가로 결여되는 결실을 포함하는 단백질을 코딩한다. 상응하는 아미노산에 대하여 다른 시클린 SDS 유사 단백질, 예를 들어 다른 종으로부터의 오르토로그의 엑손 1, 2, 3 및 4에 의해 코딩된 영역은 게놈 DNA 또는 아미노산 서열의 쌍을 이룬 정렬에 의해 확인될 수 있다. 서열식별번호: 2에 대해서만 상기 엑손이 실제 엑손 (게놈 DNA 상의 인트론에 의해 분리됨)인 것으로 결정되었지만, 다른 서열에 대해서는 상기 엑손이 정렬에 의해 결정되었고 실제 엑손이 아닐 수 있으며, 오히려 서열식별번호: 2의 엑손에 상응하는 아미노산이므로, 이는 단순히 단백질의 아미노산 영역으로서 지정될 수도 있는 것으로 인지된다.

[0101] 본 발명의 바람직한 실시양태에서 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 그의 코딩

서열의 5'-말단 (상기 단백질의 N-말단을 코딩함)에서의 돌연변이를 갖거나, 또는 이러한 돌연변이를 초래한다. 보다 바람직하게는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 그의 코딩 서열의 5'-말단에서의 점 돌연변이 및/또는 말단절단을 갖거나, 또는 그를 초래한다. 특정 유전자의 출발 코돈 (ATG)에서의 돌연변이는, 각각의 유전자가 각각의 완전한 길이의 단백질로 번역되지 않는 효과를 나타낼 것이란 사실이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 번역을 위하여 그 다음 가능한 출발 코돈 (ATG)을 사용할 수 있지만, 이는 그 다음 ATG가 동일한 리딩 프레임에서 보이기 시작하는 경우에는 N-말단에서 상기 단백질의 아미노산 서열의 말단 절단을 초래하거나 또는 상이한 아미노산 서열을 갖는 단백질의 생산을 초래할 것이다. 둘 다의 경우에, 5'-말단에서의 각각의 돌연변이는 감소되거나 또는 상실된 효소적 활성을 갖는 단백질의 생산을 초래할 것이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 출발 코돈에서의 돌연변이를 갖는다. 이러한 출발 코돈에서의 돌연변이는 그의 3개의 뉴클레오티드 중 임의의 것에서의 점 돌연변이 또는 출발 코돈의 3개의 뉴클레오티드 중 적어도 제1, 적어도 제1과 제2, 또는 적어도 모두의 결실/말단절단일 수 있다.

[0102] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태는 그의 코딩 서열의 3'-말단 (단백질의 C-말단을 코딩함)에서의 결실을 초래하는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자이다. 보존된 시클린\_C 도메인이 단백질의 C-말단에 존재하기 때문에, 시클린\_C 도메인의 일부 (예를 들어 시클린\_C 도메인의 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과의 아미노산 또는 심지어 시클린\_C 도메인의 전부)가 부재하도록 하는 말단절단은 저하된 기능을 갖거나 또는 기능이 없는 단백질을 초래할 것이다. C-말단에서의 더 긴 말단절단이 심지어 시클린\_N 도메인의 일부 또는 전부를 결실시킬 것이며, 이는 또한 저하된 기능을 갖거나 또는 기능이 없는 단백질을 초래할 것이다. 시클린\_C 도메인과 시클린\_N 도메인 사이에는 단지 5개의 아미노산이 있다. C-말단의 약 90개 이상의 아미노산을 말단절단시키면, 대부분의 시클린 SDS 유사 단백질에서 시클린\_C 도메인이 누락되며, 95, 100, 110개 또는 그 초과의 아미노산을 더 길게 말단절단시키면, 시클린\_N 도메인이 적어도 부분적으로 결실될 것이다. 앞서 언급된 바와 같이, 이러한 말단절단이 저하된 기능을 갖거나 또는 기능이 없는 단백질을 초래함에 따라 본원에 포함된다. 앞서 언급된 바와 같이, 단백질이 저하된 기능을 갖거나 또는 기능이 없는지를 시험하기 위하여, 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 돌연변이체 식물을 대상으로 표현형별로 시험하여 예상된 표현형이 발생하는지를 알아 볼 수 있다.

[0103] 바람직하게는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 단백질 코딩 서열의 3'-말단에서의 적어도 10, 20, 30, 40 또는 50개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 적어도 100개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 적어도 200개의 뉴클레오티드, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 300개의 뉴클레오티드, 추가로 바람직하게는 적어도 400개의 뉴클레오티드 및 가장 바람직하게는 적어도 500개의 뉴클레오티드, 특히 바람직하게는 적어도 615개의 뉴클레오티드의 말단절단을 초래한다. 코딩 서열로부터의 591개 뉴클레오티드에 의한 말단절단이 각각의 단백질 서열에 대한 197개 아미노산에 의한 말단절단으로 번역된다. 상응하는 야생형 시클린 SDS 유사 단백질의 아미노산 서열 (서열식별번호: 2)과 비교하여 197개 아미노산에 의한 말단절단을 갖는 시클린 SDS 유사 단백질에 대한 바람직한 예가 서열식별번호: 4 하에 제시된다. 또 다른 예는 상응하는 야생형 SDS 유사 단백질 (서열식별번호: 2)과 비교하여 339개 아미노산 (즉, 코딩 영역의 1017개 뉴클레오티드)의 말단절단이며, 이는 서열식별번호: 18에 제시된다.

[0104] 한 실시양태에서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 2의 단백질을 코딩하는 핵산 서열 (야생형과 비교하여 결실 또는 말단절단을 포함하는 코딩된 단백질을 생성시킴)에, 또는 서열식별번호: 2와의 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과의 아미노산 서열 동일성을 포함하는 단백질, 예컨대 예를 들어, 서열식별번호: 2와의 71% 서열 동일성을 갖는 서열식별번호: 6을 코딩하는 임의의 핵산 서열에 상기 언급된 돌연변이 중 임의의 것을 갖는다.

[0105] 또 다른 실시양태에서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 6의 단백질을 코딩하는 핵산 서열 (야생형과 비교하여 결실 또는 말단절단을 포함하는 코딩된 단백질을 생성시킴)에, 또는 서열식별번호: 6과의 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과의 아미노산 서열 동일성을 포함하는 단백질을 코딩하는 임의의 핵산 서열에 상기 언급된 돌연변이 중 임의의 것을 갖는다.

[0106] 또 다른 실시양태에서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 12의 단백질을 코딩하는 핵산 서열 (야생형과 비교하여 결실 또는 말단절단을 포함하는 코딩된 단백질을 생성시킴)에, 또는 서열식별번호: 12와의 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과의 아미노산 서열 동일성을 포함하는 단백질을 코딩하는 임의의 핵산 서열에 상기 언급된 돌연변이 중 임의의 것을 갖는다.

- [0107] 또 다른 실시양태에서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 19의 단백질을 코딩하는 핵산 서열 (야생형과 비교하여 결실 또는 말단절단을 포함하는 코딩된 단백질을 생성시킴)에, 또는 서열식별번호: 19과의 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과의 아미노산 서열 동일성을 포함하는 단백질을 코딩하는 임의의 핵산 서열에 상기 언급된 돌연변이 중 임의의 것을 갖는다.
- [0108] 또 다른 실시양태에서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 20의 단백질을 코딩하는 핵산 서열 (야생형과 비교하여 결실 또는 말단절단을 포함하는 코딩된 단백질을 생성시킴)에, 또는 서열식별번호: 20과의 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과의 아미노산 서열 동일성을 포함하는 단백질을 코딩하는 임의의 핵산 서열에 상기 언급된 돌연변이 중 임의의 것을 갖는다.
- [0109] 추가의 바람직한 실시양태에서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 1 하에 제시된 핵산 서열에, 또는 서열식별번호: 1 하에 제시된 핵산 서열과의 적어도 58% 또는 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90% 또는 특히 바람직하게는 적어도 95%의 동일성을 갖는 서열에 상기 언급된 돌연변이 중 임의의 것을 갖는다. 한 측면에서 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 1 하에 제시된 핵산 서열에, 또는 서열식별번호: 1 하에 제시된 핵산 서열과의 적어도 58% 또는 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 80%, 훨씬 더 바람직하게는 90% 또는 특히 바람직하게는 95%의 동일성을 갖는 변이체 서열에 돌연변이를 포함하며, 여기서 서열식별번호: 1 내의 뉴클레오티드 위치 번호 2185에서의 뉴클레오티드 구아닌 (G)이 아데닌 (A), 시토신 (C) 또는 티민 (T)에 의해 대체되고, 가장 바람직하게는 서열식별번호: 1 내의 뉴클레오티드 위치 번호 2185에서의 뉴클레오티드 구아닌 (G), 또는 변이체 서열 내의 등가의 뉴클레오티드가 아데닌 (A)에 의해 대체된다. 가장 바람직하게는, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 1 내의 뉴클레오티드 위치 번호 2185에서의 뉴클레오티드 구아닌 (G)이 아데닌 (A), 시토신 (C) 또는 티민 (T)에 의해 대체되고, 가장 특히 바람직하게는 서열식별번호: 1 내의 뉴클레오티드 위치 번호 2185에서의 뉴클레오티드 구아닌 (G)이 아데닌 (A)에 의해 대체되는 것과는 별도로, 서열식별번호: 1 하에 제시된 핵산 서열을 갖는다. 상이한 측면에서 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 1 하에 제시된 핵산 서열에, 또는 서열식별번호: 1 하에 제시된 핵산 서열과의 적어도 58% 또는 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 80%, 훨씬 더 바람직하게는 90% 또는 특히 바람직하게는 95%의 동일성을 갖는 변이체 서열에 돌연변이를 포함하며, 여기서 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에서는 뉴클레오티드 1687에서의 뉴클레오티드 시토신 (C), 또는 변이체 서열 내의 등가의 뉴클레오티드가 상이한 뉴클레오티드, 바람직하게는 티민 (T)에 의해 대체된다.
- [0110] 본 발명의 상이한 실시양태는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성하는 식물 세포, 식물 부분 또는 식물에 관한 것이며, 여기서 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 갖는다:
- [0111] a) 결실 돌연변이
  - [0112] b) 미스센스 또는 비-동의 돌연변이;
  - [0113] c) 프레임 시프트 돌연변이; 및/또는
  - [0114] d) 넌센스 돌연변이.
- [0115] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식물 세포, 식물 부분 또는 식물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이 중 하나 이상을 갖는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성한다:
- [0116] a) 결실 돌연변이
  - [0117] b) 미스센스 또는 비-동의 돌연변이;
  - [0118] c) 프레임 시프트 돌연변이; 및/또는
  - [0119] d) 넌센스 돌연변이.
- [0120] 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실 및 대체와 관련하여, 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물은 바람직하게는, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성하며, 여기서 이러한 mRNA는 야생형 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA와 비교하여 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도

7개, 적어도 8개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 13개, 적어도 14개 또는 바람직하게는 적어도 16개의 뉴클레오티드의 결실을 포함한다. 한 측면에서 상기 mRNA에서 결실된 뉴클레오티드(들)는 시클린 SDS 유사 단백질의 엑손 1, 엑손 2, 엑손 3 및/또는 엑손 4의 하나 이상의 뉴클레오티드이고/하거나 상기 mRNA에서 결실된 뉴클레오티드(들)는 시클린 SDS 유사 단백질의 시클린\_N 또는 시클린\_C 도메인의 하나 이상의 뉴클레오티드이다. 한 측면에서 이러한 뉴클레오티드는 엑손 2의 뉴클레오티드, 예를 들어 서열식별번호: 1의 뉴클레오티드 2186에서 출발하고 뉴클레오티드 2201에서 종결되는 하나 이상 또는 모든 뉴클레오티드이다.

[0121]

바람직하게는, 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물은 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성하며, 이러한 mRNA가 프레임 시프트 돌연변이 및/또는 넌센스 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 한다. 넌센스 돌연변이는 조기 정지 코돈을 창출시키므로, mRNA 코딩 서열의 말단절단을 초래한다. 본 발명의 바람직한 실시양태는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA를 포함하는 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물에 관한 것이며, 이러한 mRNA가 코딩 서열의 말단절단을 포함하는 것을 특징으로 한다. 시클린 SDS 유사 단백질의 mRNA 코딩 서열의 말단절단은 바람직하게는, 야생형 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA와 비교하여 적어도 100개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 적어도 200개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 적어도 300개의 뉴클레오티드, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 400개의 뉴클레오티드 및 추가로 보다 바람직하게는 적어도 500개의 뉴클레오티드, 특히 바람직하게는 적어도 591개의 뉴클레오티드의 말단절단이다. 한 측면에서 mRNA 코딩 서열의 말단절단은 엑손 2, 3 및 4가 부재하도록하거나; 엑손 3 및 4가 부재하도록하거나; 또는 엑손 4가 부재하도록 한다. 또 다른 측면에서 mRNA 코딩 서열의 말단절단은 엑손 1의 전부 또는 일부, 엑손 2의 전부, 엑손 3의 전부 및 엑손 4의 전부가 부재하도록 한다. 또 다른 측면에서, 프레임 시프트 돌연변이는 엑손 2의 전부 또는 일부가 상이한 리딩 프레임 내에 있도록 한다. 상이한 측면에서 프레임 시프트 돌연변이는 엑손 3 및/또는 엑손 4의 전부 또는 일부가 상이한 리딩 프레임 내에 있도록 한다. 프레임 시프트는 하나 이상의 뉴클레오티드 (3의 배수가 아닌 임의의 수, 예컨대 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 등)의 결실에 의해 유발될 수 있으며, 이로써 리딩 프레임이 변화된다.

[0122]

바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식물 세포, 식물 부분 또는 식물은 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성하고, 이러한 mRNA는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 17에 표시된 상응하는 코딩 서열과의 적어도 58% 또는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90% 또는 특히 바람직하게는 적어도 95% 서열 동일성을 가지며, 상기 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA가 넌센스 돌연변이 또는 조기 정지 코돈을 포함한다는 전제 조건이 붙는다. 한 실시양태에서 정지 코돈은 서열식별번호: 1의 엑손 1 내에, 예를 들어 뉴클레오티드 1687 내지 1689에 있다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식물 세포, 식물 부분 또는 식물은 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성하고, 이러한 mRNA는 서열식별번호: 3에 표시된 코딩 서열과의 적어도 58% 또는 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90% 또는 특히 바람직하게는 적어도 95% 서열 동일성을 가지며, 서열식별번호: 3 내의 뉴클레오티드 1096 내지 1098이 정지 코돈을 나타낸다는 전제 조건이 붙는다. 본 발명의 가장 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물은 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성하고, 이러한 mRNA는 서열식별번호: 3 하에 제시된 서열을 갖는다.

[0123]

본 발명의 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물은 하나 이상의 돌연변이를 갖는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성하며, 여기서 이러한 mRNA는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된다. 본 발명의 이들 실시양태에 의해 포함되는 것은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성하는 본 발명에 따른 식물 세포, 식물 부분 또는 식물이며, 상기 mRNA가, 그로부터 mRNA가 전사되는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 상응하는 (DNA) 코딩 서열과 비교하여, 결실 돌연변이 및/또는 미스센스 또는 비-동의 돌연변이 및/또는 프레임 시프트 돌연변이 및/또는 넌센스 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 한다. 따라서, 한 측면에서 프리-mRNA 스플라이싱에 영향을 미치는, 즉 정상적인 프리-mRNA 스플라이싱 프로세스를 변형시킴으로써, 상이한 mRNA 분자를 유발하는 임의의 돌연변이가 포괄된다.

[0124]

결실 돌연변이와 관련하여, 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물은 한 측면에서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성하며, 여기서 이러한 mRNA는, 그로부터 mRNA가 전사되는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 상응하는 (DNA) 코딩 서열과 비교하여, 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 13개, 적어도 14개 또는 적어도 16개의 뉴클레오티드의 결실을 포함한다. 한 측면에서

mRNA에서 결실된 뉴클레오티드(들)는 시클린 SDS 유사 단백질의 엑손 1, 엑손 2, 엑손 3 및/또는 엑손 4의 하나 이상의 뉴클레오티드이다. 한 측면에서 상기 뉴클레오티드는 엑손 2의 뉴클레오티드, 예를 들어 서열식별번호: 1의 뉴클레오티드 2186에서 출발하고 뉴클레오티드 2201에서 종결되는 하나 이상 또는 모든 뉴클레오티드이다.

[0125] 바람직하게는, 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립 유전자로부터 전사된 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성하며, 이러한 mRNA가, 그로부터 mRNA가 전사되는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 (DNA) 코딩 서열과 비교하여, 프레임 시프트 돌연변이 및/또는 넌센스 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 한다. 넌센스 돌연변이는 상기 mRNA에 조기 정지 코돈을 창출시키며, 이는 mRNA 코딩 서열의 3'-말단 말단절단 및 C-말단에서의 시클린 SDS 유사 단백질의 말단절단을 유발한다. 따라서 본 발명의 바람직한 실시양태는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성하는 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물에 관한 것이며, 이러한 mRNA가, 그로부터 mRNA가 전사되는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 (DNA) 코딩 서열과 비교하여, 코딩 서열의 말단절단을 포함하는 것을 특징으로 한다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 mRNA 코딩 서열의 말단절단은 바람직하게는, 그로부터 mRNA가 전사되는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 (DNA) 코딩 서열과 비교하여, 적어도 100개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 적어도 200개의 뉴클레오티드, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 300개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 적어도 400개의 뉴클레오티드 및 보다 바람직하게는 적어도 500개의 뉴클레오티드, 특히 바람직하게는 적어도 591개의 뉴클레오티드의 말단절단이다. 한 측면에서 mRNA 코딩 서열의 말단절단은 엑손 2, 3 및 4가 부재하도록 하거나; 또는 엑손 3 및 4가 부재하도록 하거나; 또는 엑손 4가 부재하도록 한다. 또 다른 측면에서 mRNA 코딩 서열의 말단절단은 엑손 1의 전부 또는 일부, 엑손 2의 전부, 엑손 3의 전부 및 엑손 4의 전부가 부재하도록 한다. 또 다른 측면에서, 프레임 시프트 돌연변이는 엑손 2의 전부 또는 일부가 상이한 리딩 프레임 내에 있도록 한다. 상이한 측면에서 프레임 시프트 돌연변이는 엑손 3 및/또는 엑손 4의 전부 또는 일부가 상이한 리딩 프레임 내에 있도록 한다. 프레임 시프트는 하나 이상의 뉴클레오티드 (3의 배수가 아닌 임의의 수, 예컨대 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 등)의 결실에 의해 유발될 수 있으며, 이로써 리딩 프레임이 변화된다.

[0126] 추가의 바람직한 실시양태에서 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물은 서열식별번호: 1에 표시된 상응하는 (DNA) 코딩 서열과의 적어도 58% 또는 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90% 또는 특히 바람직하게는 적어도 95%의 동일성을 갖는 mRNA를 포함하거나 또는 그를 합성하며, 상기 mRNA 서열이 서열식별번호: 1에 표시된 상응하는 (DNA) 코딩 서열과 비교하여 적어도 넌센스 돌연변이 또는 조기 정지 코돈을 포함하고, 바람직하게는 넌센스 돌연변이가 서열식별번호: 3 내의 뉴클레오티드 위치 1096 내지 1098에서 일어난다는 전제 조건이 붙는다. 한 측면에서 조기 정지 코돈은 서열식별번호: 1의 뉴클레오티드 1687 내지 1689에 있다. 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물은 서열식별번호: 3 하에 제시된 뉴클레오티드 서열을 갖는 mRNA를 포함한다.

[0127] "mRNA 코딩 서열"은 본원에서 통상의 의미를 가질 것이다. mRNA 코딩 서열은 티민 (T)이 우라실 (U)에 의해 대체되는 것과는 별도로, 특정 유전자/대립유전자의 각각의 DNA 코딩 서열에 상응한다.

[0128] 상기 기재된 돌연변이 또는 돌연변이의 조합 (예를 들어 프레임 시프트를 초래하는 뉴클레오티드 결실) 중 임의의 것에 대하여, 본 발명에 따른 식물 세포, 식물 부분 또는 식물 내의 시클린 SDS 유사 단백질의 활성에서의 기능 감소 또는 기능 상실의 유발을 초래하는 것으로 이해된다.

[0129] 본 발명의 또 다른 실시양태는 시클린 SDS 유사 단백질을 포함하거나 또는 그를 합성하는 식물 세포, 식물 부분 또는 식물에 관한 것이며, 시클린 SDS 유사 단백질의 아미노산 서열이 상응하는 야생형 시클린 SDS 유사 단백질과 비교하여 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 한다. 시클린 SDS 유사 단백질 내의 돌연변이는 본 발명에 따른 식물 세포, 식물 부분 또는 식물 내의 시클린 SDS 유사 단백질의 활성에서의 감소 또는 기능 상실을 유발한다.

[0130] 특히 바람직한 것은 시클린 SDS 유사 단백질을 포함하거나 또는 그를 합성하는 본 발명에 따른 식물 세포, 식물 부분 또는 식물이며, 시클린 SDS 유사 단백질의 아미노산 서열이 상응하는 야생형 시클린 SDS 유사 단백질과 비교하여 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0131] 시클린 SDS 유사 단백질에서의 돌연변이는 야생형 시클린 SDS 유사 단백질의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 대체, 삽입, 결실 및/또는 말단절단일 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서 시클린 SDS 유사 단백질의 아미노산 서열은 결실 또는 말단절단, 보다 바람직하게는 N-말단 및/또는 C-말단에서의 말단절단, 훨씬 더 바람직하게는 C-말단에서의 말단절단을 포함한다. 상응하는 야생형 시클린 SDS 유사 단백질과 비교하여, 바람

직하게는 적어도 10개, 적어도 25개, 바람직하게는 적어도 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개, 보다 바람직하게는 적어도 150개 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 197개 또는 적어도 200, 250, 300 또는 339개의 아미노산이 아미노산 서열의 N-말단 끝 또는 C-말단 끝으로부터 누락된다. C-말단과 관련하여, 시클린 SDS 유사 단백질에서의 돌연변이는 상응하는 야생형 시클린 SDS 유사 단백질과 비교하여 적어도 25개, 바람직하게는 적어도 50, 60, 70, 80, 90개, 바람직하게는 적어도 100개, 보다 바람직하게는 적어도 150개 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 197개 또는 적어도 200, 250, 300 또는 339개의 아미노산의 말단절단이다. 또 다른 측면에서 시클린 SDS 유사 단백질에서의 돌연변이는 엑손 2, 3 및 4에 의해 코딩된 아미노산이 부재하도록 하거나; 또는 엑손 3 및 4에 의해 코딩된 아미노산이 부재하도록 하거나; 또는 엑손 4에 의해 코딩된 아미노산이 부재하도록 한다. 또 다른 측면에서 상기 돌연변이는 엑손 1에 의해 코딩된 아미노산의 전부 또는 일부, 엑손 2에 의해 코딩된 아미노산 전부, 엑손 3에 의해 코딩된 아미노산 전부 및 엑손 4에 의해 코딩된 아미노산 전부가 부재하도록 한다. 또 다른 측면에서, 상기 돌연변이는 엑손 2에 의해 코딩된 아미노산의 전부 또는 일부가 상이한 아미노산에 의해 대체되도록 한다 (예를 들어 리딩 프레임 시프트에 기인함). 상이한 측면에서 상기 돌연변이는 엑손 3 및/또는 엑손 4의 전부 또는 일부에 의해 코딩된 아미노산이 상이한 아미노산에 의해 대체되도록 한다 (예를 들어 리딩 프레임 시프트에 기인함). 상이한 측면에서 상기 돌연변이는 시클린\_C 및/또는 시클린\_N 도메인의 전부 또는 일부가 부재하도록 한다. 또한 상이한 측면에서 상기 돌연변이는 하나 이상의 아미노산이 대체, 삽입 또는 결실된 시클린\_C 및/또는 시클린\_N 도메인을 초래한다.

[0132]

추가로 제공되는 것은 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 18 하에 제시된 아미노산 서열과의 적어도 58% 또는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90% 또는 특히 바람직하게는 적어도 95% 동일성을 갖는 시클린 SDS 유사 단백질을 포함하거나 또는 그를 합성하는 본 발명에 따른 식물 세포, 식물 부분 또는 식물이다. 가장 바람직한 실시양태에서 상기 식물 세포, 식물 부분 또는 식물에 포함되거나 또는 이에서 합성된 단백질은 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 18 하에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.

[0133]

따라서 본 발명의 추가 실시양태는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 종 수박, 멜론, 오이, 토마토 및 페퍼로부터 선택된 식물 세포 또는 식물에 관한 것이며, 상기 돌연변이체 대립유전자가 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이 중 하나 이상을 포함하거나 또는 그를 실시하는 것을 특징으로 한다:

[0134]

a) 계놈 서열에서의 결실, 말단절단, 삽입, 점 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 미스센스 또는 비-동의 돌연변이, 스플라이스-부위 돌연변이, 프레임 시프트 돌연변이;

[0135]

b) 하나 이상의 조절 서열에서의 돌연변이;

[0136]

c) 코딩 서열에서의 결실, 말단절단, 삽입, 점 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 미스센스 또는 비-동의 돌연변이, 스플라이스-부위 돌연변이, 프레임 시프트 돌연변이;

[0137]

d) 프리-mRNA 또는 mRNA에서의 결실, 말단절단, 삽입, 점 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 미스센스 또는 비-동의 돌연변이, 스플라이스-부위 돌연변이, 프레임 시프트 돌연변이; 및/또는

[0138]

e) 시클린 SDS 유사 단백질 내의 하나 이상의 아미노산의 결실, 말단절단, 삽입 또는 대체.

[0139]

상기 돌연변이체 대립유전자는 야생형 시클린 SDS 유사 단백질과 비교하여 돌연변이체 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 초래한다. 이러한 감소된 활성은 시클린 SDS 유사 유전자의 발현의 녹아웃, 이러한 유전자의 발현의 녹다운, 코딩된 돌연변이체 시클린 SDS 유사 단백질의 기능 상실 또는 돌연변이체 시클린 SDS 유사 단백질의 기능 감소에 기인한다.

[0140]

식물 세포 또는 식물이 수박인 한 측면에서, 시클린 SDS 유사 단백질의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 2의 단백질, 또는 기능적인 SDS 유사 단백질의 2개의 완전한 길이의 서열을 쌍을 이루어 정렬할 때 서열식별번호: 2와의 상당한 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 서열 동일성을 포함하는 단백질을 코딩하는 대립유전자의 돌연변이체 대립유전자이다.

[0141]

식물 세포 또는 식물이 멜론인 또 다른 측면에서, 시클린 SDS 유사 단백질의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 6의 단백질, 또는 기능적인 SDS 유사 단백질의 2개의 완전한 길이의 서열을 쌍을 이루어 정렬할 때 서열식별번호: 6과의 상당한 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 서열 동일성을 포함하는 단백질을 코딩하는 대립유전자의 돌연변이체 대립유전자이다.

- [0142] 식물 세포 또는 식물이 오이인 또 다른 측면에서, 시클린 SDS 유사 단백질의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별 번호: 12의 단백질, 또는 기능적인 SDS 유사 단백질의 2개의 완전한 길이의 서열을 쌍을 이루어 정렬할 때 서열식별번호: 12와의 상당한 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 서열 동일성을 포함하는 단백질을 코딩하는 대립유전자의 돌연변이체 대립유전자이다.
- [0143] 식물 세포 또는 식물이 토마토인 또 다른 측면에서, 시클린 SDS 유사 단백질의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 19의 단백질, 또는 기능적인 SDS 유사 단백질의 2개의 완전한 길이의 서열을 쌍을 이루어 정렬할 때 서열식별번호: 19와의 상당한 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 서열 동일성을 포함하는 단백질을 코딩하는 대립유전자의 돌연변이체 대립유전자이다.
- [0144] 식물 세포 또는 식물이 페퍼인 또 다른 측면에서, 시클린 SDS 유사 단백질의 돌연변이체 대립유전자는 서열식별 번호: 20의 단백질, 또는 기능적인 SDS 유사 단백질의 2개의 완전한 길이의 서열을 쌍을 이루어 정렬할 때 서열식별번호: 20과의 상당한 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 서열 동일성을 포함하는 단백질을 코딩하는 대립유전자의 돌연변이체 대립유전자이다.
- [0145] 한 측면에서 수박, 멜론, 오이, 토마토 또는 페퍼 식물을 돌연변이체 시클린 SDS 유사 대립유전자를 이형접합성 형태로 포함한다. 또 다른 측면에서 수박, 멜론, 오이, 토마토 또는 페퍼 식물을 돌연변이체 시클린 SDS 유사 대립유전자를 동형접합성 형태로 포함함으로써, 상기 식물은 자신의 꽃가루 또는 다른 꽃가루와의 수분 시 씨없는 과실을 생산한다. 바람직한 측면에서 돌연변이체 시클린 SDS 유사 대립유전자는 녹아웃되거나 (즉, 유전자가 발현되지 않음) 또는 상기 대립유전자는 기능이 없는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩한다.
- [0146] 종자로부터 이러한 식물이 성장될 수 있는 것인 종자 뿐만 아니라 대립유전자가 동형접합성 형태인 경우에 상기 식물로부터 생산된 씨없는 과실 또는 대립유전자가 이형접합성 형태인 경우에 상기 식물로부터 생산된 씨있는 과실이 본원에 포괄된다. 또한, 계놈에 적어도 하나의 돌연변이체 시클린 SDS 유사 대립유전자를 포함하는 임의의 식물 부분, 예컨대 커팅, 영양 번식물, 세포 등이 제공된다.
- [0147] 또한, 돌연변이체 시클린 SDS 유사 대립유전자의 적어도 하나의 카페를 포함하는 번식 및 비-번식 세포가 본원에 제공된다. 이러한 번식 및 비-번식 세포가 식물 기관 또는 전체 식물의 일부일 수 있거나, 또는 이를 들어 세포 또는 조직 배양물에서 단리될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0148] 계놈에 적어도 하나의 돌연변이체 시클린 SDS 유사 대립유전자를 포함하는, 본원에 제공된 종자, 식물 및 식물 부분은 바람직하게는 농학적으로 유용한 식물, 예를 들어 근친 교배 계통, 육종 계통, 품종 또는 재배종 또는 F1 잡종이다. 바람직하게는 이들은 우수한 작물 식물 특징을 가지며, 특히 우수한 과실 품질 및 과실 균일성의 시장성있는 과실을 생산한다.
- [0149] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "품종" 또는 "재배종"은 가장 낮은 것으로 공지된 계급의 단일 식물학상 분류군 내의 식물 그룹화를 의미하며, 소정의 유전자형 또는 유전자형의 조합으로부터 비롯된 특징의 표현에 의해 정의될 수 있다.
- [0150] "F1 잡종" 식물 (또는 F1 잡종 종자)은 두 근친 교배 부모 계통을 교배하여 수득된 세대이다. 따라서, F1 잡종 종자는, 종자로부터 F1 잡종 식물이 성장하는 것인 종자이다. F1 잡종은 잡종 강세로 인해 더 왕성하고 더 많이 수확된다. 근친 교배 계통은 계놈 내의 대부분의 로커스에서 본질적으로 동형접합성이다.
- [0151] "식물 계통" 또는 "육종 계통"은 식물 및 그의 자손을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "근친 교배 계통"은 반복적으로 자가 수분되었고 거의 동형접합성인 식물 계통을 지칭한다. 따라서, "근친 교배 계통" 또는 "부모 계통"은 높은 균일성을 지닌 식물 계통을 생성시키는, 수 세대 (예를 들어 적어도 5, 6, 7세대 또는 그 초파)의 근친 교배를 진행한 식물을 지칭한다.
- [0152] 수박 시클린 SDS 유사 대립유전자는 계놈의 염색체 7 (뉴클레오티드 7450185와 7445051 사이) 상에 위치한다. 염색체 위치는, 예를 들어 [icugi.org/pub/genome/watermelon/97103](http://icugi.org/pub/genome/watermelon/97103) 하의 월드 와이드 웹 상에서 전체 계놈에 대항하여 BLAST를 수행함으로써 결정될 수 있다. 오이 시클린 SDS 유사 대립유전자는 또한, 오이 계놈의 염색체 5 (뉴클레오티드 848447과 852718 사이) 상에 위치하는 것으로 보인다 ([icugi.org/pub/genome/cucumber/Chinese\\_long/](http://icugi.org/pub/genome/cucumber/Chinese_long/) 하의 월드 와이드 웹).
- [0153] 수박의 경우, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 NCIMB 42532 하에 기탁된, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성 또는 동형접합성인 수박 종자로부터 수득될 수 있다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 야생형 대립유전자는 NCIMB 42532 하에 기탁된, 야

생형 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자에 대해 이형접합성 또는 동형접합성인 수박 종자로부터 수득될 수 있다. 이와 같이 기탁된 종자에 대하여, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 각각의 대립유전자는 *emb1*로 지명되었다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 다른 돌연변이체 대립유전자는, 예를 들어 돌연변이유발에 의해 또는 통상의 기술자에게 공지된 다른 방법에 의해 새로이 생성될 수 있다. 이는 어떠한 식물 종에도 적용된다.

[0154] 수박에서 또 다른 돌연변이체 SDS 유사 대립유전자를 새롭게 생성하는 한 가지 예가 본 실시예에 제공된다. 여기에서, 본 발명자들은 수박 종자를 돌연변이유발함으로써 돌연변이체 집단을 생성시킨 다음, TILLING을 사용하여 돌연변이체 SDS 유사 대립유전자를 포함하는 식물을 확인하였다. 이와 같이 확인된 대립유전자는 서열식별번호: 1의 뉴클레오티드 1687에서의 단일 뉴클레오티드 대체 (이는 정지 코돈을 초래함)를 포함한다. 따라서 돌연변이체 대립유전자는 야생형 단백질의 아미노산 1 내지 223만을 포함하는 말단절단된 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩한다 (서열식별번호: 18 참조).

[0155] NCIMB 42532 하에 기탁된, SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 대립유전자에 대해 이형접합성 또는 동형접합성인 종자로부터 수득가능하고/수득된 식물 세포, 식물 부분 또는 식물 또는 그의 자손이 또한, 본 발명의 실시양태이다. 바람직한 실시양태에서 NCIMB 42532 하에 기탁된 종자로부터 수득된 식물 세포, 식물 부분 또는 식물 또는 그의 자손은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성이다. 본 발명의 추가로 포함된 실시양태는 기탁 수탁 번호 NCIMB 42532의 종자로부터 수득된 수박 식물을 또 다른 식물과 교배한 후에 수득된/수득가능한 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 식물 세포, 식물 부분 또는 식물에 관한 것이다. 바람직하게는 기탁 수탁 번호 NCIMB 42532의 종자로부터 수득된 식물을 또 다른 식물과 교배한 후에 수득된/수득가능한 식물 세포 또는 식물은 연속해서 자가 수분시키고, 임의로 추가의 단계에서 씨없는 과실을 생산하는 식물을 선별하고/하거나 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 식물을 선별한다.

[0156] 용어 "대립유전자(들)"는 특정한 로커스에서 특정 유전자의 하나 이상의 대체 형태 중 임의의 것을 의미하며, 이의 대립유전자 모두는 특이적 로커스에서의 하나의 형질 또는 특징에 관한 것이다. 유기체의 이배체 세포에서, 소정의 유전자의 대립유전자는 특이적 위치, 또는 염색체 상의 로커스 (복수 개의 로커스들)에 위치한다. 하나의 대립유전자가 상동 염색체 쌍의 각각의 염색체 상에 존재한다. 이배체 식물 종은 특정한 로커스에서 다수의 상이한 대립유전자를 포함할 수 있다. 이들은 유전자의 동일한 대립유전자 (동형접합성) 또는 2개의 상이한 대립유전자 (이형접합성)일 수 있다.

[0157] "야생형 대립유전자"는 본원에서, 완전히 기능적인 단백질 (야생형 단백질)을 코딩하는 유전자의 베전을 지칭한다. 완전히 기능적인 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자의 서열은, 예를 들어 서열식별번호: 1 (재배된 수박으로부터 유래됨) 및 서열식별번호: 5 (재배된 멜론으로부터 유래됨) 하에 제시된 야생형 시클린 SDS 유사 단백질 서열의 코딩 서열이다. 이러한 야생형 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자에 의해 코딩된 아미노산 서열이 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 6에 각각 묘사된다. 다른 야생형 시클린 SDS 유사 단백질은 서열식별번호: 12 (오이), 서열식별번호: 19 (토마토) 및 서열식별번호: 20 (페퍼) 하에 제시된다. 완전히 기능적인 시클린 SDS 유사 단백질 대립유전자 (즉, 변이체 대립유전자, 또는 대립유전자성 변이체)를 코딩하는 다른 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 핵산 서열은 다른 식물에 존재하고, 적어도 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 5 하에 제시된 핵산 서열의 코딩 서열과의 상당한 서열 동일성을 포함하거나, 또는 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 12, 또는 서열식별번호: 19 또는 서열식별번호: 20 하에 제시된 아미노산 서열과의 상당한 서열 동일성을 포함할 수 있다. 예를 들어 서열식별번호: 12의 재배된 오이 시클린 SDS 유사 단백질은 멜론의 야생형 시클린 SDS 유사 단백질 (서열식별번호: 6)과의 86% 아미노산 서열 동일성을 가지며, 수박의 야생형 SDS 유사 단백질 (서열식별번호: 2)과의 70% 아미노산 서열 동일성을 갖는다.

[0158] "돌연변이체 대립유전자"는 본 발명과 연계해서, 상응하는 야생형 대립유전자와 비교하여 돌연변이를 갖는 대립유전자를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA의 한 예가 서열식별번호: 3 하에 제시된다. 서열식별번호: 3 하에 제시된 mRNA에 의해 코딩된 상응하는 아미노산 서열이 서열식별번호: 4 하에 제시된다.

[0159] 용어 "로커스" (복수 개의 로커스들)는, 예를 들어 유전자 또는 유전적 마커가 발견되는 염색체 상의 특이적 장소(들) 또는 부위를 의미한다.

[0160] 핵산 분자 (DNA 또는 RNA)에서의 "돌연변이"는 상응하는 야생형 서열과 비교하여, 예를 들어 하나 이상의 뉴클레오티드의 대체, 결실 또는 삽입에 의한 하나 이상의 뉴클레오티드의 변화이다. 이러한 돌연변이의 예는 점

돌연변이, 넌센스 돌연변이, 미스센스 돌연변이, 스플라이스-부위 돌연변이, 프레임 시프트 돌연변이 또는 조절 서열에서의 돌연변이이다.

[0161] "핵산 분자"는 관련 기술분야에서의 통상적인 의미를 가질 것이다. 이는 당 테옥시리보스 (DNA) 또는 리보스 (RNA) 중 하나를 포함하는 뉴클레오티드로 구성된다.

[0162] "점 돌연변이"는 단일 뉴클레오티드의 대체, 또는 단일 뉴클레오티드의 삽입 또는 결실이다.

[0163] "넌센스 돌연변이"는 특정 단백질을 코딩하는 핵산 서열에서의 (점) 돌연변이이며, 이로써 핵산 분자 내의 코돈이 정지 코돈으로 변화된다. 이로써 초기 정지 코돈이 mRNA에 존재하게 되고, 말단절단된 단백질이 번역된다. 말단절단된 단백질은 감소된 기능을 갖거나 또는 기능 상실될 수 있다.

[0164] "미스센스 또는 비-동의 돌연변이"는 특정 단백질을 코딩하는 핵산 서열에서의 (점) 돌연변이이며, 이로써 특정 코돈이 상이한 아미노산을 코딩하도록 변화된다. 이로써 생성된 단백질은 감소된 기능을 갖거나 또는 기능 상실될 수 있다.

[0165] "스플라이스-부위 돌연변이"는 특정 단백질을 코딩하는 핵산 서열에서의 돌연변이이며, 이로써 프리-mRNA의 RNA 스플라이싱이 변화되어, 야생형과 상이한 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상이한 뉴클레오티드 서열을 갖는 mRNA가 생성된다. 이로써 생성된 단백질은 감소된 기능을 갖거나 또는 기능 상실될 수 있다.

[0166] "프레임 시프트 돌연변이"는 특정 단백질을 코딩하는 핵산 서열에서의 돌연변이이며, 이로써 mRNA의 리딩 프레임이 변화되어, 상이한 아미노산 서열을 생성시킨다. 이로써 생성된 단백질은 감소된 기능을 갖거나 또는 기능 상실될 수 있다.

[0167] 본 발명의 맥락에서 "결실"은 상응하는 야생형 서열의 핵산 서열과 비교하여 소정의 핵산 서열 내의 어디든지 적어도 하나의 뉴클레오티드가 누락되거나, 또는 상응하는 (야생형) 서열의 아미노산 서열과 비교하여 소정의 아미노산 서열 내의 어디든지 적어도 하나의 아미노산이 누락되는 것을 의미할 것이다.

[0168] "말단절단"은 상응하는 야생형 서열의 핵산 서열과 비교하여 뉴클레오티드 서열의 3'-말단 또는 5'-말단 중 하나에서의 적어도 하나의 뉴클레오티드가 누락되거나, 또는 상응하는 야생형 단백질의 아미노산 서열과 비교하여 단백질의 N-말단 또는 C-말단 중 하나에서의 적어도 하나의 아미노산이 누락됨으로써, 3'-말단 또는 C-말단 말단절단에서는, 적어도 5'-말단에서의 첫 번째 뉴클레오티드 또는 N-말단에서의 첫 번째 아미노산이 각각 여전히 존재하고, 5'-말단 또는 N-말단 말단절단에서는, 적어도 3'-말단에서의 마지막 뉴클레오티드 또는 C-말단에서의 마지막 아미노산이 각각 여전히 존재한다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 5'-말단은 상응하는 야생형 핵산 서열의 번역에서 출발 코돈으로서 사용된 ATG 코돈에 의해 결정된다.

[0169] "대체"는 각각의 단백질의 코딩 서열 내의 뉴클레오티드의 교환으로 인해, 상응하는 야생형 핵산 서열 또는 상응하는 야생형 아미노산 서열 각각과 비교하여, 핵산 서열 내의 적어도 하나의 뉴클레오티드 또는 단백질 서열 내의 적어도 하나의 아미노산이 상이하다는 것을 의미할 것이다.

[0170] "삽입"은 핵산 서열 또는 단백질의 아미노산 서열이 상응하는 야생형 핵산 서열 또는 상응하는 야생형 아미노산 서열 각각과 비교하여, 적어도 하나의 부가 뉴클레오티드 또는 아미노산을 포함한다는 것을 의미할 것이다.

[0171] 본 발명의 맥락에서 "조기 정지 코돈"은 정지 코돈이, 상응하는 야생형 코딩 서열의 정지 코돈과 비교하여, 5'-말단에서의 출발 코돈에 더 근접하게 코딩 서열 (cds)에 존재하는 것을 의미한다.

[0172] "조절 서열에서의 돌연변이", 예를 들어 유전자의 프로모터 또는 인핸서에서의 돌연변이는 야생형 서열과 비교하여, 예를 들어 하나 이상의 뉴클레오티드의 대체, 결실 또는 삽입에 의한 하나 이상의 뉴클레오티드의 변화이며, 이로써, 예를 들어 만들어지는 유전자의 mRNA 전사체가 감소되거나 또는 mRNA 전사체가 없어진다.

[0173] "동형접합성"은 세포 또는 유기체 내의 상응하는 염색체 로커스에서의 소정의 유전자 또는 대립유전자의 모든 카페가 동일하다는 것을 의미하는 것으로 본원에 지칭된다. "돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성"은 세포 또는 유기체 내의 상응하는 염색체 로커스에서의 각각의 돌연변이체 대립유전자의 모든 카페가 동일하다는 것을 의미한다.

[0174] "이형접합성"은 세포 또는 유기체 내의 특이적 염색체 로커스에서의 소정의 유전자 또는 대립유전자의 적어도 하나의 카페가, 다른 염색체(들) 내의 상응하는 로커스/로커스들에서의 유전자(들) 또는 대립유전자(들)의 다른 카페와 상이하다는 것을 의미하는 것으로 본원에 지칭된다. "돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성"은 세포 또는 유기체 내의 특이적 염색체 로커스에서의 적어도 하나의 대립유전자가, 다른 염색체(들) 내의 상응하는

로커스/로커스들에서의 대립유전자(들)와 상이한 서열을 갖는다는 것을 의미한다.

[0175] "단백질에서의 돌연변이"는 아생형 서열과 비교하여, 예를 들어 하나 이상의 아미노산 잔기의 대체, 결실, 밀단 절단 또는 삽입에 의한 하나 이상의 아미노산 잔기의 변화이다.

[0176] 돌연변이를 식물 세포 또는 식물의 목적하는 유전자/대립유전자 내로 도입하기 위한 생물공학적 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 따라서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 이들 방법을 사용함으로써 식물 세포 또는 식물에서 생산될 수 있다. 이러한 기술의 예는 특히, 식물의 계놈에서 이중 가닥 DNA 파손을 유도하는 돌연변이유발 기술 또는 효소 (이중 가닥 DNA 파손 유도 효소 (DSBI))이다. 공지되고 실시된 기술은 희귀-절단 엔도뉴클레아제 및 맞춤형 희귀-절단 엔도뉴클레아제이며, 이는 메가뉴클레아제로 지칭되기도 하는 귀소 엔도뉴클레아제, 뉴클레아제의 촉매적 도메인과 융합된 전사 활성화제 유사 이펙터 (TALEN) 및 소위 CRISPR/Cas 시스템을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0177] 이들 모든 기술은 돌연변이를 식물 세포 또는 식물 내의 유전자 내로 도입하는데 적격이다. 따라서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 갖는 본 발명에 따른 식물 세포 및 식물 (여기서, 돌연변이를 상기 돌연변이체 대립유전자 내로 도입하는 것은 희귀-절단 엔도뉴클레아제 또는 맞춤형 희귀-절단 엔도뉴클레아제에 대해서 이루어짐)이 또한, 본 발명의 실시양태이다. 맞춤형 희귀-절단 엔도뉴클레아제와 관련하여, 시클린 SDS 유사 단백질의 돌연변이체 대립유전자에서의 돌연변이는 바람직하게는, 메가뉴클레아제, TALEN 또는 CRISPR/Cas 시스템에 의해 도입되었다.

[0178] 본원에 사용된 바와 같은, "이중 가닥 DNA 파손 유도 효소 (DSBI)"는 "인식 부위"로 지칭되는 특정한 뉴클레오티드 서열에서의 이중 가닥 DNA 파손을 유도할 수 있는 효소이다. 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 약 14 내지 70 개의 연속되는 뉴클레오티드의 인식 부위를 갖는 DSBI 효소이므로, 심지어 더 큰 계놈, 예컨대 대부분의 식물 계놈에서 극히 낮은 절단 횟수를 갖는다.

[0179] "메가뉴클레아제로 지칭되기도 하는 귀소 엔도뉴클레아제"는 이러한 희귀-절단 엔도뉴클레아제의 특정 계열을 구성한다. 이들은 인트론, 독립적인 유전자 또는 개재 서열에 의해 코딩될 수 있고, 이들을, 통상적으로 박테리아 제한-변형 유형 II 시스템으로부터의 보다 고전적인 제한 효소와 구별시켜 주는 현저한 구조적 및 기능적 특성을 제시한다. 그들의 인식 부위는 대부분의 제한 효소 인식 부위의 특징적인 이중염색체 대칭과 대조되는 일반적인 비대칭성을 가지고 있다. 인트론 또는 인테인에 의해 코딩된 몇 가지 귀소 엔도뉴클레아제가 대립유전자성의 인트론 없는 또는 인테인 없는 부위 내로의 그들 각각의 유전적 요소의 귀소를 증진시키는 것으로 밝혀졌다. 인트론 없는 또는 인테인 없는 대립유전자 내에 부위 특이적 이중 가닥 파손을 만들도록, 이들 뉴클레아제는 재조합 유전성 말단을 창출시키며, 이는 코딩 서열을 복제하고 DNA 수준에서 인트론 또는 개재 서열의 삽입을 초래하는 유전자 전환 프로세스에 개입한다.

[0180] 다른 희귀-절단 메가뉴클레아제 및 그들 각각의 인식 부위의 목록이 WO 03/004659의 표 1 (17면 내지 20면) (본원에 참조로 포함됨)에 제공된다. 이들은 I-Sce I, I-Chu I, I-Dmo I, I-Cre I, I-Csm I, PI-F1i I, Pt-Mtu I, I-Ceu I, I-Sce II, I-Sce III, HO, PI-Civ I, PI-Ctr I, PI-Aae I, PI-BSU I, PI-DhaI, PI-Dra I, PI-Mav I, PI-Mch I, PI-Mfu I, PI-Mf1 I, PI-Mga I, PI-Mgo I, PI-Min I, PI-Mka I, PI-Mle I, PI-Mma I, PI-Msh I, PI-Msm I, PI-Mth I, PI-Mtu I, PI-Mxe I, PI-Npu I, PI-Pfu I, PI-Rma I, PI-Spb I, PI-Ssp I, PI-Fac I, PI-Mja I, PI-Pho I, PI-Tag I, PI-Thy I, PI-Tko I 또는 PI-Tsp I를 포함한다.

[0181] 더욱이, 기본적으로 선택되는 임의의 표적 뉴클레오티드 서열을 인식하는 "맞춤형 희귀-절단 엔도뉴클레아제"를 설계하는 방법이 이용 가능하다. 간략하게 언급하면, 특이적 뉴클레오티드 서열을 인식하도록 설계된 징크-핑거 도메인과 자연 제한 효소, 예컨대 FokI로부터의 비-특이적 DNA 절단 도메인 간의 혼성체를 사용하여 키메라 제한 효소를 제조할 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어 WO 03/080809, WO94/18313 또는 WO95/09233 및 문헌 [Isalan et al., 2001, Nature Biotechnology 19, 656-660; Liu et al. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5525-5530]에 기재되어 있다. 맞춤형 메가뉴클레아제는 WO2004/067736에 기재된 바와 같이, 변이체의 라이브리리로부터 선택함으로써 생성될 수 있다. 변경된 서열 특이성과 DNA 결합 친화성을 수반한 맞춤형 메가뉴클레아제가 또한, WO2007/047859에 기재된 바와 같이 합리적인 설계를 통해 수득될 수 있다.

[0182] 주문 설계된 엔도뉴클레아제의 또 다른 예는 뉴클레아제 (예를 들어 FOK1)의 촉매적 도메인과 융합된 박테리아 크산토모나스(*Xanthomonas*) 속으로부터의 전사 활성화제 유사 이펙터 (TALE)에 근거하는 소위 "TALE 뉴클레아제 (TALEN)"를 포함한다. 이들 TALE의 DNA 결합 특이성은 텐덤 배열된 34/35-아미노산 반복 단위의 반복 가변 이잔기 (RVD)에 의해 규정되므로, 하나의 RVD는 표적 DNA 내의 하나의 뉴클레오티드를 특이적으로 인식한다. 반

복 단위를 어셈블리하여 기본적으로 임의의 표적 서열을 인식할 수 있고, 그를 뉴클레아제의 촉매적 도메인과 융합시켜 서열 특이적 엔도뉴클레아제를 창출시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Boch et al., 2009, Science 326:p1509-1512; Moscou and Bogdanove, 2009, Science 326:p1501; Christian et al., 2010, Genetics 186:p757-761]; 및 WO10/079430, WO11/072246, WO2011/154393, WO11/146121, WO2012/001527, WO2012/093833, WO2012/104729, WO2012/138927, WO2012/138939 참조). WO2012/138927에는 단량체성 (소형) TALEN, 및 다양한 촉매적 도메인 및 그의 조합을 수반한 TALEN이 추가로 기재된다.

- [0183] 최근에는, 새로운 유형의 맞춤 설정가능한 엔도뉴클레아제 시스템이 기재되어 있으며; 소위 "CRISPR/Cas 시스템"은 연합된 뉴클레아제 Cas9의 절단을 가이드하기 위해 서열 특이성을 부여하는 특수 RNA 분자 (crRNA)를 이용한다 (Jinek et al., 2012, Science 337:p816-821). 이러한 주문 설계된 희귀-절단 엔도뉴클레아제가 비-자연적으로 발생하는 희귀-절단 엔도뉴클레아제로서 지칭되기도 한다.
- [0184] 돌연변이를 식물 세포 또는 식물의 유전자/대립유전자 내로 도입하는 것으로 관련 기술분야에 공지된 추가의 방법은 소위 "생체내 돌연변이유발"이다. 각각의 기술에 관한 추가의 논의가 하기 본원에 제공된다.
- [0185] 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 갖는 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물 (여기서, 돌연변이를 상기 돌연변이체 대립유전자 내로 도입하는 것은 생체내 돌연변이유발에 의해 이루어짐)이 또한 본 발명의 실시양태이다.
- [0186] 관련 기술분야에 통상적으로 공지된 다양한 기술이 식물 세포 또는 식물에서 삽입 돌연변이를 창출시키는데 적합하다.
- [0187] 본 발명의 추가 실시양태는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 갖는 본 발명에 따른 식물 세포 및 식물이며, 여기서 돌연변이를 상기 돌연변이체 대립유전자 내로 도입하는 것은 삽입 돌연변이 유발에 의해 이루어진다.
- [0188] 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 갖는 본 발명에 따른 식물 세포 및 본 발명에 따른 식물은 소위 삽입 돌연변이유발에 의해 생산될 수 있다. 특히, 트랜스포손 및 전달 DNA (T-DNA) 서열을, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자/대립유전자 내로 삽입하는 것이, 그들이 통합되는 각각의 유전자/대립유전자의 발현 및/또는 활성을 감소시키는데 적합하다 (Thorneycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601).
- [0189] 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 각각의 기술에 관한 부가의 논의가 하기 본원에 추가로 제공될 것이다.
- [0190] "삽입 돌연변이유발"은 특히, 트랜스포손 또는 소위 전달 DNA (T-DNA)를, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자 내로 삽입함으로써, 그 결과로서, 관련되는 세포 내에서의 시클린 SDS 유사 단백질의 활성이 감소되거나 또는 비-기능적인 시클린 SDS 유사 단백질이 생산되는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0191] 추가의 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식물은 웅성 가임 식물이다.
- [0192] 본 발명에 따른 식물은 웅성 가임이고, 돌연변이체 시클린 SDS 유사 대립유전자가 동형접합성 형태로 존재하는 경우에 씨없는 과실을 생산한다. 웅성 불임 식물에 비해 웅성 가임 식물의 이점은 이들이 생육성 꽃가루를 생산할 것이므로, 씨없는 과실 생산 자성 식물 상에서의 착과 및 발달을 유도하기 위해 제2의 소위 꽃가루 매개자 식물을 동일한 밭에 심을 필요가 없다는 것이다. 따라서 전체 재배 면적에 씨없는 과실을 생산하는 식물을 심을 수 있어, 재배된 면적당 씨없는 과실의 수확량을 증가시킬 수 있다. 또한, 배주와 꽃가루가 동일한 식물에 의해 생산되기 때문에, 웅성 및 자성 식물 부분에 대하여 개화와 수정 시기의 동기화가 제공된다. 이렇게 하면 가능한 가장 많은 양의 과실을 생산하기에 충분한 수분이 일어나게 할 수 있다.
- [0193] 본 발명의 맥락에서, "웅성 가임 식물"은 생육성 꽃가루를 생산하는 식물인 것으로 이해되어야 한다. 생육성 또는 가임성 꽃가루가 생산된다는 것은, 예를 들어 또 다른 상이한 식물을 타가 수분시키기 위하여 각각의 식물로부터의 꽃가루를 사용하고, 이러한 교배로부터 생육성 종자를 수득함으로써 나타낼 수 있다.
- [0194] 본 발명에 따른 식물의 씨없는 과실 생산 표현형은 한 측면에서, 이배체 식물에서 뿐만 아니라 다배수성 식물에서도 생성된다. 한 측면에서 본 발명에 따른 식물은 또한 이들이 상이한 배수성 정도를 가질 때 씨없는 과실을 생산한다. 따라서 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물은 짹수의 배수성 정도 ( $2n$ ,  $4n$ ,  $6n$ ,  $8n$  등)를 수반한 식물 및 홀수의 배수성 정도 ( $3n$ ,  $5n$  등)를 수반한 식물을 포함하는 임의의 배수성 정도를 갖는 식물을 포함하는 것으로 널리 이해된다. 한 측면에서, 돌연변이체 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자는 이배체 식물에서

동형접합성이지만, 또 다른 측면에서 돌연변이체 SDS 유사 단백질은 다배수성 식물, 예컨대 사배체 수박에서 동형접합성이다. "다배수성 식물에서의 동형접합성"은 각각의 염색체 상의 로코스가 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 포함하지만, 야생형 대립유전자는 그렇지 않다는 것을 의미한다.

[0195] 다배수성화는 식물에 널리 퍼져있다. 이는 유전적 다양성을 증가시키고 견고성, 크기, 활력 및 질병 저항의 증가를 나타내는 종의 생산에 대해 책임이 있다. 다배수체 식물에 대한 명백한 이점은 잡종 강세와 유전자 중복이다.

[0196] 오늘날 재배되고 있는 수많은 넓은 에이커 및 농장 작물은 하나 이상의 계놈 복제가 진행되었다. 그 예는 목화(증배 계수 x6), 감자 (x2, x3), 빵 밀 (x3), 오일 종자 (x3), 옥수수 (x2), 대두 (x2), 해바라기 (x2), 바나나 (x2), 사과 (x2) 및 커피 (x2)이다 (Renny-Byfield 7 Wendel, 2014, American J. Botany, 101(10), 1711-1725).

[0197] 특히 채소 육종에서는, 다양한 식물에서의 다배수성이 콜키신, 콜카민, 오리잘린, 콜세미드, 트리플루랄린 또는 아미프로포스메틸을 포함한 화학물질의 사용에 의해 유도되었다. 화학물질의 사용에 의해 생산된 채소류에서의 계놈 복제에 대한 예는 반수체 식물로부터의 이배체 봉울다다기 양배추 (2x), 사배체 완두 (2x), 사배체 수박 (2x), 사배체 머스크멜론 (2x), 사배체 양파 (2x), 팔배체 코코암 (4x), 사배체 뱀오이 (2x), 삼배체 및 사배체 세로 흠이 형성된 호박 (1,5x, 2x), 사배체 오이 (2x) 및 사배체 강남콩 (2x)이다 (Kazi, 2015, J. Global Biosciences 4(3), 1774-1779).

[0198] 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 식물은 관련 기술분야의 기술자에게 통상적으로 공지된 다양한 방법에 의해 생산될 수 있다. 이들 방법은 수탁 번호 NCIMB 42532 하에 기탁된 종자의 사용을 포함한다. 이들 기탁된 종자의 특정한 이점은 상기 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 종자로부터 성장한 식물이 웅성 가임일 것이란 사실이다. 따라서, 이들 식물에 존재하는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 다른 식물, 특히 다른 수박 식물, 특히 재배된 수박을 수정시키기 위하여 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 식물의 꽃가루를 사용함으로써 다른 식물 내로 도입될 수 있다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자가 열성이기 때문에, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 우성 야생형 대립유전자가 각각의 식물에 존재하지 않는 경우에만 씨없는 과실 생산이 관찰된다. 따라서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 야생형 대립유전자가 식물에 존재하는 경우에는, 이들 식물이 씨있는 과실을 생산한다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 이배체 종자(예를 들어 기탁 수탁 번호 NCIMB 42532 또는 그의 자손)로부터, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 열성 돌연변이체 대립유전자를 함유하지 않는 또 다른 식물로 전달할 때, F1 세대는 이형접합성일 것이고 씨없는 과실 표현형을 드러내지 않을 것이다. F1은 먼저, 존재하는 열성 돌연변이체 대립유전자의 2개 카피(동형접합성)로 인해 씨없는 과실 표현형을 포함하는 식물을 수득하기 위하여 자가 수분될 필요가 있다.

[0199] 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 2개 카피를 포함하는 이배체 식물을 사용하여, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 4개 카피를 포함하는 사배체 식물을 만들 수 있다. 이러한 사배체는 이배체와 동일한 표현형을 가질 것이며, 즉 씨없는 과실 (이는 사배체임) 및 생육성 꽂가루를 생산할 것이다.

[0200] 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 사배체 식물로부터, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 열성 돌연변이체 대립유전자를 포함하지 않는 또 다른 사배체 식물로 전달할 때, F1 세대는 이형접합성일 것이고 씨없는 과실 표현형을 드러내지 않는다. 또한, 이러한 씨없는 과실 표현형은 자가 수분된 F1 세대로부터 수득된 세대에서만 관찰될 것이다.

[0201] 언급된 바와 같이, 씨없는 과실 표현형을 포함하는 사배체 식물은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 이배체 식물(예를 들어 기탁 수탁 번호 NCIMB 42532로부터의, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 종자로부터, 또는 기탁 수탁 번호 NCIMB 42532의 종자로부터 수득된 식물을 또 다른 식물과 교배시키고, 임의로 연속해서 이러한 교배로부터 수득된 식물을 자가 수분시킨 후에 수득된 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 식물로부터)의 염색체를 복제함으로써 생성시킬 수 있다. 이로써 수득된 사배체 식물은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 4개 카피를 포함한다.

[0202] 식물의 유성 생식 세포 (꽃가루 및 배주)가 이러한 식물의 나머지 세포 세트의 절반인 염색체 세트를 포함한다

는 것이 관련 기술분야에서 통상적으로 이해된다. 식물 꽃가루 및 배주는 전체 식물로 재생될 수 있다. 짹수의 배수성 정도를 갖는 식물의 경우에는, 따라서 일반적으로, 꽃가루 또는 배주의 재생 시 배수성 정도가 절반으로 감소되는 것이 가능하다. 짹수의 배수성 정도 (예를 들어 2n, 4n, 6n, 8n 등)를 갖는 본 발명에 따른 식물로부터, 이등분된 염색체 세트 (예를 들어 각각 1n, 2n, 3n, 4n 등)를 갖는 식물이 꽃가루 또는 배주 재생을 통하여 생산될 수 있다.

[0203] 본 발명에 따른 이배체 식물은, 예를 들어 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 꽃가루 또는 배주 세포로부터 재생될 수 있으며, 이러한 꽃가루 또는 배주 세포는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 사배체 식물로부터 수득된다. 바람직하게는, 사배체 식물로부터 수득되는 꽃가루 또는 배주 세포는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 동형접합성 상태로 포함한다. 이어서, 이로써 유래된 이배체 식물은 추가의 육종에 사용될 수 있고, 씨없는 과실 표현형을 갖는 식물을 생성시키는데 사용될 수 있다.

[0204] 삼배체 식물은 본 발명에 따른 이배체 (2n) 식물을 본 발명에 따른 사배체 (4n) 식물과 교배함으로써 생산될 수 있다. 이러한 교배로부터 유래되는 잡종 식물 종자는 삼배체 (3n)일 것이다. 바람직하게는 서로 교배된 본 발명에 따른 이배체 (2n) 및 사배체 (4n) 식물은 둘 다, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성이다. 이로써 생성된 삼배체 종자 (및 이러한 종자로부터 성장한 삼배체 식물)는 상기 돌연변이체 대립유전자의 3개 카페를 가질 것이다. 삼배체 잡종을 생산하기 위해 사용된 이배체 식물은, 예를 들어 기탁 수탁 번호 NCIMB 42532의 종자로부터 수득된 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 종자로부터 수득된/수득가능한 식물일 수 있다.

[0205] 방금 기재된 방법들 중 하나에 의해 수득가능한/수득된 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 식물 (예를 들어 이배체, 삼배체 또는 사배체, 또는 또 다른 배수성) 및 식물 부분 (예컨대 과실)이 또한 본 발명의 실시양태이다. 또한 종자로부터 이러한 식물이 성장될 수 있는 것인 종자가 본 발명의 실시양태이다.

[0206] 본 발명의 바람직한 실시양태에서 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물은 짹수의 배수성 정도를 가지며, 바람직하게는, 이들은 이배체 (2n) 또는 사배체 (4n)이다.

[0207] 홀수의 배수성 정도를 갖는 식물, 예를 들어 삼배체 (3n) 식물은 통상적으로 웅성 및 자성 불임이며, 이는 감수 분열 동안 염색체가 딸 세포로 동등하게 분할될 수 없기 때문이다. 홀수의 배수성 정도를 수반한 식물, 예를 들어 삼배체 (3n) 식물에 비해 짹수의 배수성 정도를 수반한 식물이 생육성 꽃가루 및/또는 생육성 배주를 생산할 수 있다는 것이다. 그 결과로서, 짹수의 배수성 정도를 수반한 식물은 홀수의 배수성 정도를 수반한 식물에서의 착과 및 발달을 유도하는데 필요한 제2의 상이한 소위 꽃가루 매개자 식물을 필요로 하지 않으면서도 성장할 수 있다. 꽃가루 매개자 식물은 또한, 통상적으로 씨를 보유하게 될 (또는 씨있는) 과실을 생산할 것이다. 이를 씨 보유 과실은 수확 시 또는 수확 후에 씨없는 과실로부터 분리되어야 한다. 따라서, 짹수의 배수성 정도를 갖는 식물은 홀수의 배수성 정도를 갖는 식물에 비해 이점을 갖고 있으며, 이는 꽃가루 매개자 식물에 의해 생산된 원하지 않는 씨 보유 과실을 목적하는 씨없는 과실로부터 분리시킬 필요가 없다는 것이다.

[0208] 본 발명의 맥락에서 "짜수의 배수성 정도"는 세포 또는 유기체에 존재하는 상동 염색체 세트의 수를 2로 나누면 정수가 된다는 것을 의미한다. 따라서 이러한 세포 또는 유기체는 이배체 (2n), 사배체 (4n), 육배체 (6n), 팔배체 (8n) 등이다.

[0209] 본 발명의 맥락에서 "홀수의 배수성 정도"는 세포 또는 유기체에 존재하는 상동 염색체 세트의 수를 2로 나누면 정수가 되지 않는다는 것을 의미한다. 따라서 이러한 세포 또는 유기체는 반수체 (1n), 삼배체 (3n) 등이다.

[0210] 본 발명의 맥락에서 "이배체 식물 세포 또는 식물"은 2n으로서 본원에 지명된, 상응하는 염색체 2세트를 갖는 식물, 영양 식물 부분(들), 과실 또는 종자 또는 식물 세포를 의미한다.

[0211] 본 발명의 맥락에서 "사배체 세포 또는 식물"은 4n으로서 본원에 지명된, 상응하는 염색체 4세트를 갖는 식물, 영양 식물 부분(들), 과실 또는 종자 또는 식물 세포를 의미한다.

[0212] 본 발명에 따른 식물 세포는 전체 식물이 되도록 재생될 수 있는 식물 세포, 또는 전체 식물이 되도록 재생될 수 없는 식물 세포일 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 식물 세포는 전체 식물을 재생시키기에 적격이지 않은 식물 세포일 수 있다.

- [0213] 바람직한 실시양태에서 본 발명에 따른 식물은 웅성 가임이고 짹수성 정도를 갖는다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 식물은 웅성 가임이고 이배체 ( $2n$ ) 또는 사배체 ( $4n$ )이다.
- [0214] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식물은 위단위결실성 식물이다. 보다 바람직하게는 본 발명에 따른 식물은 웅성 가임 위단위결실성 식물이다. 훨씬 더 바람직하게는 본 발명에 따른 식물은 웅성 가임, 위단위결실성이고 짹수의 배수성 정도를 갖는다. 특히 바람직한 것은 웅성 가임, 위단위결실성의 이배체 ( $2n$ ) 또는 사배체 ( $4n$ )인 본 발명에 따른 식물이다.
- [0215] 위단위결실성 식물은 씨없는 과실을 생산한다. 웅성 가임 위단위결실성 식물은 동일한 면적에서 성장한 상이한 꽃가루 매개자 식물을 필요로 하지 않지만, 그럼에도 불구하고 씨없는 과실을 생산한다는 점에서 공지된 위단위결실성 식물에 비해 이점을 갖는다. 꽃가루 매개자 식물은 원하지 않는 씨 보유 과실을 생산할 것이며, 이는 씨없는 과실로부터 분리되어야 할 것이다. 따라서, 위단위결실성 웅성 가임 식물은 목적하는 씨없는 과실을 생산하는 식물과 수분자 식물 간에 성장 공간과 영양분을 놓고 경쟁하지 않는다는 이점을 가지며, 이는 이용 가능한 재식 면적당 목적하는 씨없는 과실의 수확량을 증가시켜 준다.
- [0216] "위단위결실"은 일반적으로 관련 기술분야에서 이해되며, 또한 본 발명과 연계해서, 착과 및 발달을 유도하기 위해서는 수분이 필요하지만 그 과실이 성숙한 또는 생육성 종자를 생산할 필요가 없다는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 성숙한 또는 생육성 종자는 성숙되기 전에 저지된 종자 발달 또는 배주 및/또는 배아 및/또는 내배유의 퇴행 또는 배주 및/또는 배아 및/또는 내배유의 발육 부진으로 인해 위단위결실성 식물에서 발달되지 않는다.
- [0217] 위단위결실과 차별화되는 것이 단위결실이다. "단위결실"은 일반적으로 관련 기술분야에서 이해되며, 또한 본 발명과 연계해서, 자성 배주의 수정 없이도 과실의 발달을 설명하기 위한 것으로 이해되어야 한다. 과실을 생산하는데에 수분 과정이 필요하지 않지만, 이러한 수분 결여에 따른 결과로서 과실에는 씨가 없다.
- [0218] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식물은 씨없는 과실을 생산한다.
- [0219] 본 발명에 따른 식물의 과실은 씨와 유사한 외관을 갖는 구조를 함유할 수 있다. 씨와 유사한 외관을 갖는 이들 구조는 암갈색 또는 흑색이고 경질인 야생형 식물의 씨와 비교하여 정상적으로 백색이고 연질이다. 본 발명에 따른 식물의 과실 내에 씨와 유사한 외관을 갖는 구조는 종종, 비어 있는 씨로서 표시된다. 그러나, 이는 생육성 배아를 포함하지는 않지만 배주 외피로부터 유래되는 구조이기 때문에 진짜 씨가 아니다.
- [0220] 본 발명의 보다 바람직한 실시양태에서 본 발명에 따른 식물은 씨없는 과실을 생산하고/하거나 웅성 가임이고/이거나 짹수의 배수성 정도를 가지고/가지거나 위단위결실성이다. 훨씬 더 바람직하게는 본 발명에 따른 식물은 씨없는 과실을 생산하고, 웅성 가임이며, 이배체 ( $2n$ ) 또는 사배체 ( $4n$ )이고 위단위결실성이다.
- [0221] 용어 "과실"은 그의 식물학상 의미에서, 속씨식물 꽃의 씨방으로부터 발달된 씨 보유 구조인 것으로 통상적으로 이해된다.
- [0222] "과실"의 식물학상 의미에 다소 모순되긴 하지만, 관련 기술분야 및 특히 육종에서 통상적으로 사용되는 바와 같은 "씨없는 과실"은 본 발명의 맥락에서, 성숙한 또는 생육성 종자를 수반하지 않은 과실인 것으로 이해되어야 한다. 성숙한 또는 생육성 종자는 각각의 식물에 적절한 조건 하에 토양에서 발아되고 식물로 성장할 수 있다. 이러한 시험을 사용하여, 식물이 씨없는 과실을 생산하는지를 결정할 수 있다. 씨없는 과실은 각각의 식물에 적절한 조건 하에 발아되고 식물로 성장하게 될 종자를 생산하지 않을 것이다.
- [0223] 본원에 개시된 씨없는 과실의 생산에 대한 원인이 되는 유전자를 알게 됨으로써, 다양한 공지된 방법에 의해 씨 없는 과실 생산 식물을 생산하는 것이 본 발명에서 가능하다. 이들 방법은 비-기능적인 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 돌연변이체 대립유전자, 또는 감소된 기능 또는 기능 상실을 수반한 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 돌연변이체 대립유전자를 갖는 식물을 생산 및 선별하는 것을 필요로 할 수 있거나, 또는 화학물질, 고 에너지 방사선 (예를 들어 X선, 중성자 방사선, 감마 방사선 또는 UV 방사선)과 같은 통상적인 돌연변이체의 사용을 필요로 할 수 있다. 이는 또한, 비-기능적인 시클린 SDS 유사 단백질을 갖거나 또는 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 갖는 식물을 생산하는 유전자 기술을 통해 가능하다.
- [0224] 본 발명에 따른 식물은 하나 이상의 돌연변이를 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 대립유전자 내로 도입함으로써 생산될 수 있다.
- [0225] 따라서 본 발명의 추가 실시양태는 하기 단계를 포함하는, 식물의 생산 방법에 관한 것이다:

- [0226] a) 식물 집단 내에 돌연변이를 도입하는 단계,
- [0227] b) 씨없는 과실을 생산하는 웅성 가임 식물을 선별하는 단계,
- [0228] c) b) 하에 선별된 식물이 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 대립유전자에서의 돌연변이를 갖는지를 검증하는 단계, 임의로
- [0229] d) c) 하에 수득된 식물을 성장시키고/재배하는 단계.
- [0230] 따라서 한 측면은 하기 단계를 포함하는 식물의 생산 방법이며,
- [0231] a) 식물 집단 내에 돌연변이를 도입하는 단계,
- [0232] b) 씨없는 과실을 생산하는 웅성 가임 식물을 선별하는 단계,
- [0233] c) b) 하에 선별된 식물이 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 대립유전자에서의 돌연변이를 갖는지를 검증하고, 이러한 돌연변이를 포함하는 식물을 선별하는 단계, 및 임의로
- [0234] d) c) 하에 수득된 식물을 성장시키고/재배하는 단계,
- [0235] 여기서 상기 유전자의 야생형 대립유전자는 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 12 또는 서열식별번호: 19 또는 서열식별번호: 20의 군으로부터 선택된 단백질 중 어느 하나와의 적어도 60% 서열 동일성을 포함하는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩한다.
- [0236] 그러나, 한 측면에서 상기 단계의 순서는 상이할 수도 있다.
- [0237] 따라서 한 측면에서 식물의 생산 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0238] a) 식물 집단 내에 돌연변이를 도입하는 단계,
- [0239] b) 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 대립유전자에서의 돌연변이를 갖는 식물을 확인하는 단계, 및 임의로
- [0240] c) 이러한 식물이 웅성 가임인지의 여부 및 상기 식물, 또는 자가 수분에 의해 생산된 자손 식물이 씨없는 과실을 생산하는지의 여부를 결정하는 단계.
- [0241] 임의로, 상기 방법은 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 적어도 하나의 카페를 포함하는 식물을 선별하는 것을 포함한다. 이러한 돌연변이체 대립유전자가 동형접합성 형태일 때, 씨없는 과실의 생산을 초래한다. 상기 대립유전자를 포함하는 식물은 웅성 가임이다.
- [0242] 한 측면에서 상기 유전자의 야생형 대립유전자는 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 12 또는 서열식별번호: 19 또는 서열식별번호: 20의 군으로부터 선택된 단백질 중 어느 하나와의 적어도 60% 서열 동일성을 포함하는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩한다.
- [0243] 또한, 이들 방법의 단계 a) (즉, 식물 집단 내에 돌연변이를 도입하는 단계)가 상기 방법에서 생략될 수도 있다.
- [0244] "식물 집단"은 본 발명의 맥락에서, 2개 이상의 전체 식물을 의미할 것이고, 또한 식물 부분, 과실, 종자 또는 식물 세포를 포함할 것이다. 각각의 경우에 식물 부분, 과실, 종자 또는 식물 세포는 2개 이상의 식물로부터 유래되며, 이는 "식물 부분, 과실, 종자 또는 식물 세포의 집단"과 관련해서, 이러한 식물 부분, 과질, 종자 또는 식물 세포가 각각 단일 식물로부터 수득되지 않고 복수 개의 식물로부터 수득된다는 것을 의미한다.
- [0245] 화학적으로 유도된 돌연변이를 생성하기 위해 사용될 수 있는 화학적 물질, 및 상응하는 돌연변이유발원의 효과로부터 비롯되는 돌연변이는, 예를 들어 문헌 [Ehrenberg and Husain, 1981, (Mutation Research 86, 1-113), Mueller, 1972 (Biologisches Zentralblatt 91 (1), 31-48)]에 기재된다. 감마 방사선, 에틸 메탄 술포네이트 (EMS), N-메틸-N-니트로스우레아 또는 소듐 아지드 ( $\text{NaN}_3$ )를 사용하는 벼 돌연변이체의 생성은, 예를 들어, 문헌 [Jauhar and Siddiq (1999, Indian Journal of Genetics, 59 (1), 23-28), Rao (1977, Cytologica 42, 443-450), Gupta and Sharma (1990, Oryza 27, 217-219) and Satoh and Omura (1981, Japanese Journal of Breeding 31 (3), 316-326)]에 기재된다.  $\text{NaN}_3$  또는 말레산 히드라지드를 사용하는 밀 돌연변이체의 생성은 문헌 [Arora et al. (1992, Annals of Biology 8 (1), 65-69)]에 기재된다. 상이한 유형의 에너지 풍부 방사선 및 화학적 물질을 사용하여 밀 돌연변이체를 생성하는 것에 관한 개요가 문헌 [Scarascia-Mugnozza et al. (1993, Mutation Breeding Review 10, 1-28)]에 제시된다. 문헌 [Svec et al. (1998, Cereal Research

Communications 26 (4), 391-396)]에는 라이밀에서의 돌연변이를 생성하기 위한 N-에틸-N-니트로스우레아의 용도가 기재된다. 가장 돌연변이체를 생성하기 위한 MMS (메틸 메탄 술폰산) 및 감마 방사선의 용도가 문헌 [Shashidhara et al. (1990, Journal of Maharashtra Agricultural Universities 15 (1), 20-23)]에 기재된다.

[0246] 주로 영양 번식하는 식물 종에서의 돌연변이체의 제조가 기재되어 있으며, 예를 들어 변형된 전분을 생산하는 감자에 관해서는 문헌 [Hovenkamp-Hermelink et al. (1987, Theoretical and Applied Genetics 75, 217-221)]에 보고되었고, 증가된 오일 수확량 또는 변형된 오일 품질을 나타내는 민트에 관해서는 문헌 [Dwivedi et al., 2000, Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22, 460-463]에 기재되어 있다.

[0247] 이들 방법 모두는 기본적으로, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자에서 돌연변이체 대립유전자를 생성하기 위한 본 발명에 따른 식물의 생산 방법에 적합하다. 본 발명에 따른 식물의 생산 방법에서 바람직하게는 돌연변이체 집단은, 돌연변이를 도입하기 위하여 식물 또는 식물의 종자에 에틸 메탄 술포네이트 (EMS)를 적용함으로써 생성된다.

[0248] 씨없는 과실을 생산하는 식물을 선별하는 것은 과실의 간단한 가시적 스크리닝/표현형 검사에 의해 수행될 수 있다. 씨 없음의 표현형은 동형접합성 상태에서만 관찰되기 때문에, 표현형 검사하기 전에 돌연변이유발된 식물 집단을 자가 수분시키는 것이 바람직하다. 가임성 꽃가루가 식물에 의해 생산된다는 것은, 예를 들어 또 다른 상이한 자성 가임 식물을 타가 수분시키기 위하여 각각의 식물로부터의 꽃가루를 사용함으로써 나타낼 수 있다. 이러한 교배로부터의 종자가 생육성인 경우, 상기 타가 수분에 사용된 꽃가루는 가임성이었다. 적절한 대립유전자, 특히 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 대립유전자에서의 돌연변이는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법의 도움으로 찾을 수 있다. 특히, 프로브와의 혼성화에 기반한 분석 (서던 블롯), 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 통한 증폭, 관련 게놈 서열의 서열분석 및 개별 뉴클레오티드 교환에 관한 검색이 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다. 혼성화 패턴에 근거하여 돌연변이를 확인하는 방법은, 예를 들어 제한 단편 길이 차이 (제한 단편 길이 다형성; RFLP)에 통하여 검색하는 것이다 (Nam et al., 1989, The Plant Cell 1, 699-705; Leister and Dean, 1993, The Plant Journal 4 (4), 745-750). PCR에 근거한 방법은, 예를 들어, 증폭된 단편 길이 차이 (증폭된 단편 길이 다형성; AFLP)의 분석이다 (Castiglioni et al., 1998, Genetics 149, 2039-2056; Meksem et al., 2001, Molecular Genetics and Genomics 265, 207-214; Meyer et al., 1998, Molecular and General Genetics 259, 150-160). 제한 엔도뉴클레아제로 절제된 증폭된 단편 (절단된 증폭된 다형성 서열; CAPS)의 사용이 또한, 돌연변이의 확인에 이용될 수 있다 (Konieczny and Ausubel, 1993, The Plant Journal 4, 403-410; Jarvis et al., 1994, Plant Molecular Biology 24, 685-687; Bachem et al., 1996, The Plant Journal 9 (5), 745-753). SNP의 결정 방법이 특히, 문헌 [Qi et al. (2001, Nucleic Acids Research 29 (22), e116), Drenkard et al. (2000, Plant Physiology 124, 1483-1492) and Cho et al. (1999, Nature Genetics 23, 203-207)]에 기재되어 있다. 몇 가지 식물을 대상으로 하여 특정 유전자에서의 돌연변이에 관하여 단시간 내에 연구할 수 있도록 하는 방법이 특히 적합하다. 이러한 방법, 소위 TILLING (게놈 내에서의 표적화 유도된 국소 병변)이 문헌 [McCallum et al. (2000, Plant Physiology 123, 439-442)]에 기재되어 있다.

[0249] 또한 오늘날 다른 방법이 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 갖는 본 발명에 따른 식물 세포 및 본 발명에 따른 식물을 확인하는데 유용하다는 것이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 이들 방법은, 예를 들어 소위 정방향 스크리닝 접근법을 포함한다. 정방향 스크리닝 접근법에서는 돌연변이체 집단이 생성된다. 이러한 돌연변이체 집단의 식물, 예를 들어 M2 식물을 대상으로 하여 씨없는 과실 생산 식물에 관하여 스크리닝 한 다음, 매핑 집단을 생성하기 위하여 다양한 상이한 근친 교배 계통과 교배시킨다. 이어서, 매핑 집단을 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해 분석하여, 씨없는 과실 표현형을 유발하는 대립유전자를 확인한다. 식물 세포 또는 식물이 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는지를 확인하기 위한 다른 방법은 관련 기술분야에 통상적인 방법, 및 예를 들어, 문헌 [Thomson (2014, Plant Breeding and Biotechnology 2, 195-212)]에서 논의된 방법을 이용하는 SNP 마커 분석 및 각각의 대립유전자의 서열분석을 포함한다.

[0250] 이들 방법은 기본적으로, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 갖는 본 발명에 따른 식물 세포 및 본 발명에 따른 식물을 확인하는데 적합하다.

[0251] 본 발명에 따른 식물의 생산 방법에서 확인된 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 갖는 웅성 가임의 씨없는 과실 생산 식물을 성장시키는 것은 온실에서 또는 밭에서 통상적인 방법에 의해 수행

될 수 있다. 이들 식물의 재배 및/또는 번식은 관련 기술분야에 통상적인 방법, 예컨대 예를 들어, 커팅, 시험관내 조작, 세포, 원형질체, 배아 또는 캘러스 배양물 또는 미세번식에 의해 또는 상이한 뿌리줄기에 커팅을 접목시킴으로써 수행될 수 있다.

[0252] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 식물의 생산 방법은 본 발명에 따른 식물을 생산하는데 사용된다. 따라서 본 발명에 따른 식물에 대하여 상기 기재된 바람직한 실시양태가 본 발명에 따른 식물의 생산 방법에 적용가능하다.

[0253] 본 발명에 따른 식물의 생산 방법에 의해 수득가능한/수득된 식물이 또한, 본 발명의 실시양태이다.

[0254] 유전자 기술에서 이용가능한 다양한 방법은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 갖거나 또는 비-기능적인 시클린 SDS 유사 단백질을 갖거나 또는 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 갖거나 또는 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 발현을 나타내는 식물을 생산할 수 있는 추가의 가능성을 부여한다.

[0255] 이들 방법 모두는 외래 또는 몇 가지 외래 핵산 분자를 식물 세포 또는 식물의 계놈 내로 도입하는 것에 근거하므로, 기본적으로 본 발명에 따른 식물 세포 및 본 발명에 따른 식물을 생산하는데 적합하다.

[0256] 따라서 본 발명의 추가 실시양태는 하기 단계를 포함하는, 식물의 생산 방법에 관한 것이다:

[0257] a) 외래 핵산 분자를 식물 내로 도입하는 단계로서, 여기서 외래 핵산 분자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단계:

[0258] i) 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 내인성 유전자의 발현에서의 저하를 일으키는 적어도 하나의 안티센스 RNA를 코딩하는 DNA 분자;

[0259] ii) 공동-억제 효과를 통하여, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 내인성 유전자의 발현에서의 저하를 초래하는 DNA 분자;

[0260] iii) 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 내인성 유전자의 특이적 전사체를 분할하는 적어도 하나의 리보자임을 코딩하는 DNA 분자;

[0261] iv) 적어도 하나의 안티센스 RNA 및 적어도 하나의 센스 RNA를 동시에 코딩하는 DNA 분자로서, 여기서 상기 안티센스 RNA 및 상기 센스 RNA는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 내인성 유전자의 발현에서의 저하를 일으키는 이중 가닥 RNA 분자를 형성하는 (RNAi 기술) 것인 DNA 분자;

[0262] v) 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 내인성 유전자에서의 이종 서열의 삽입 또는 돌연변이를 초래하는, 생체내 돌연변이유발을 통하여 도입된 핵산 분자로서, 여기서 돌연변이 또는 삽입은 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자의 발현에서의 저하를 일으키거나 또는 불활성 시클린 SDS 유사 단백질의 합성을 초래하는 것인 핵산 분자;

[0263] vi) 항체를 코딩하는 핵산 분자로서, 여기서 항체는 이러한 항체의 내인성 시클린 SDS 유사 단백질에의 결합으로 인해 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 내인성 유전자의 활성에서의 감소를 초래하는 것인 핵산 분자;

[0264] vii) 트랜스포손을 함유하는 DNA 분자로서, 여기서 이들 트랜스포손의 통합은, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 내인성 유전자의 발현에서의 저하를 일으키거나 또는 불활성 시클린 SDS 유사 단백질의 합성을 초래하는, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 내인성 유전자에서의 돌연변이 또는 삽입을 초래하는 것인 DNA 분자;

[0265] viii) 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 내인성 유전자에서의 삽입으로 인해, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 내인성 유전자의 발현에서의 저하를 일으키거나 또는 불활성 시클린 SDS 유사 단백질의 합성을 초래하는 T-DNA 분자; 및/또는

[0266] ix) 희귀-절단 엔도뉴클레아제 또는 맞춤형 희귀-절단 엔도뉴클레아제, 바람직하게는 메가뉴클레아제, TALEN 또는 CRISPR/Cas 시스템을 코딩하는 핵산 분자,

[0267] b) 씨없는 과실을 생산하는 식물을 선별하는 단계, 임의로

[0268] c) b) 하에 선별된 식물이, 계놈 내로 외래 핵산 분자가 통합된 적이 없는 야생형 식물과 비교하여 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 갖는지를 검증하는 단계, 및 임의로

- [0269] d) c) 하에 수득된 식물을 성장시키고/재배하는 단계.
- [0270] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법은 웅성 가임 식물의 생산 방법에 관한 것이며, 이는 웅성 가임이고 씨없는 과실을 생산하는 식물의 선별이 이루어진다는 (단계 b 및/또는 c에서) 것을 의미한다.
- [0271] 본 발명에 따른 식물 세포 또는 식물에서, 또는 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법에서 시클린 SDS 유사 단백질의 활성 감소는 안티센스 또는 공동-억제 구축물의 발현에 의해 야기될 수 있다.
- [0272] 안티센스 또는 공동-억제 기술을 통해 유전자의 발현을 억제하기 위해서, 예를 들어, 임의의 기존의 플랭킹 서열을 포함한, 시클린 SDS 유사 단백질에 대한 전체 코딩 서열을 포함하는 DNA 분자 뿐만 아니라 이러한 코딩 서열의 일부만을 포함함으로써 이를 일부가 세포에서 안티센스 효과 또는 공동-억제 효과를 각각 생성시키기에 충분히 길어야만 하는 DNA 분자를 사용할 수 있다. 일반적으로, 20 bp 또는 21 bp (또는 뉴클레오티드)의 최소 길이, 바람직하게는 적어도 100 bp (또는 뉴클레오티드), 특히 바람직하게는 적어도 500 bp (또는 뉴클레오티드)의 최소 길이까지의 서열이 적합하다. 예를 들어, 상기 DNA 분자는 21-100 bp (또는 뉴클레오티드), 바람직하게는 100-500 bp (또는 뉴클레오티드), 특히 바람직하게는 500 bp (또는 뉴클레오티드) 초과의 길이를 갖는다.
- [0273] 식물 세포에서 발생하는 내인성 서열과의 고도의 동일성을 가지며 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 사용하는 것이 또한, 안티센스 또는 공동-억제 제제에 적합하다. 최소 동일성은 약 65% 초과, 바람직하게는 80% 초과여야 한다. 적어도 90%, 특히 95% 내지 100%의 동일성을 갖는 서열을 사용하는 것이 바람직해야 한다. 용어 "서열 동일성"의 의미는 본원의 다른 곳에서 정의된다.
- [0274] 더욱이, 인트론, 즉 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자의 비-코딩 영역의 사용이 또한, 안티센스 또는 공동-억제 효과를 달성시키는 것으로 생각될 수 있다. 전분 생합성 단백질을 코딩하는 유전자의 유전자 발현을 억제하기 위하여 인트론 서열을 사용하는 것이, 예를 들어 국제 특허 출원 WO97/04112, WO97/04113, WO98/37213, WO98/37214에 기재되어 있다.
- [0275] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 안티센스 및 공동-억제 효과를 달성하는 방법을 알고 있다. 예를 들어, 공동-억제 방법은 문헌 [Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui and Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621)]에 기재되어 있다.
- [0276] 세포에서 특정한 효소의 활성을 저하시키기 위한 리보자임의 발현이 또한, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 이는, 예를 들어, EP-B1 0321201에 기재된다. 식물 세포에서의 리보자임의 발현이, 예를 들어, 문헌 [Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250, (1996), 329-338)]에 기재되어 있다.
- [0277] 본 발명에 따른 식물 세포 및 식물에서, 또는 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법에서 시클린 SDS 유사 단백질의 활성 감소는 또한, 억제될 각각의 표적 유전자, 바람직하게는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 센스 및 안티센스 RNA 분자의 동시 발현 (RNAi 기술)에 의해 야기될 수 있다.
- [0278] 이는, 예를 들어, 각각의 표적 유전자의 "역위 반복 서열" 또는 표적 유전자의 일부를 함유하는 키메라 구축물을 사용함으로써 달성될 수 있다. 이러한 경우, 일반적 구축물은 각각의 표적 유전자의 센스 및 안티센스 RNA 분자를 코딩한다. 센스 및 안티센스 RNA는 식물체에서 RNA 분자로서 동시에 합성되며, 여기서 센스 및 안티센스 RNA는 스페이서에 의해 서로 분리되고, 이중 가닥 RNA 분자를 형성할 수 있다.
- [0279] 역위 반복 서열 DNA 구축물을 식물 세포 또는 식물의 계획 내로 도입하는 것이, 이러한 역위 반복 서열 DNA 구축물에 상응하는 유전자를 억제하는 매우 유효한 방법이라는 것이 밝혀졌다 (Waterhouse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, (1998), 13959-13964; Wang and Waterhouse, Plant Mol. Biol. 43, (2000), 67-82; Singh et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 925- 927; Liu et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 927-929); Smith et al., (Nature 407, (2000), 319-320); 국제 특허 출원 WO99/53050 A1). 표적 유전자(들)의 센스 및 안티센스 서열은 또한, 유사하거나 또는 상이한 프로모터를 통해 서로 별도로 발현될 수 있다 (Nap, J-P et al., 6<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular

Biology, Quebec, 18th-24th June, 2000; Poster S7-27, Presentation Session S7). 따라서 본 발명에 따른 식물 세포 또는 본 발명에 따른 식물에서의 시클린 SDS 유사 단백질의 활성 감소는 또한, 이중 가닥 RNA 분자를 생성함으로써 달성될 수 있다. 이와 관련하여, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자 또는 cDNA의 DNA 분자의 "역위 반복 서열"이 바람직하게는, 식물의 게놈 내로 도입되며, 여기서 전사될 DNA 분자 (시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자 또는 cDNA, 또는 이를 유전자 또는 cDNA의 단편)는 상기 DNA 분자의 발현을 제어하는 프로모터의 제어 하에 있다.

[0280] 따라서 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산 분자 중 임의의 것의 단편이 또한 본 발명의 측면이다. 이러한 단편은, 예를 들어 프라이머 또는 프로브로서의 다양한 용도를 갖거나, 또는 형질전환 백터 내로 혼입될 수 있고 씨없는 과실을 생산하는 식물을 생성시키기 위해 사용될 수 있다.

[0281] 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산 분자의 상기 단편은 다양한 크기일 수 있으며, 예를 들어 적어도 10개의 뉴클레오티드, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 적어도 100개, 적어도 200개, 적어도 300개, 적어도 400개, 적어도 500개의 뉴클레오티드 또는 그 초과일 수 있다.

[0282] 이것 외에도, 식물에서 프로모터 DNA 분자로부터 이중 가닥 RNA 분자를 트랜스로 형성하는 것이, 하기에 표적 프로모터로서 지정될 이들 프로모터의 상동 카피의 메틸화 및 전사 불활성화를 초래할 수 있는 것으로 공지되어 있다 (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). 따라서 표적 프로모터를 불활성화시킴으로써, 자연적으로 이러한 표적 프로모터의 제어 하에 있는 특정한 표적 유전자 (예를 들어 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자)의 유전자 발현을 저하시키는 것이 가능하다. 이것은, 이러한 경우에 억제될 유전자 (표적 유전자)의 표적 프로모터를 포함하는 DNA 분자가, 식물에서의 프로모터의 본래의 기능과 반대로 유전자 또는 cDNA의 발현에 대한 제어 요소로서 사용되지 않고, 그 자체가 전사가능한 DNA 분자로서 사용된다는 것을 의미한다.

[0283] RNA 헤어핀 분자로서 거기에 존재할 수 있는, 식물체에서의 이중 가닥 표적 프로모터 RNA 분자의 생성을 위하여, 표적 프로모터 DNA 분자의 "역위 반복 서열"을 함유하는 구축물을 사용하는 것이 바람직하며, 여기서 상기 표적 프로모터 DNA 분자는 이러한 표적 프로모터 DNA 분자의 유전자 발현을 제어하는 프로모터의 제어 하에 있다. 이를 구축물은 연속해서, 식물의 게놈 내로 도입된다. 식물체에서의 상기 표적 프로모터 DNA 분자의 "역위 반복 서열"의 발현은 이중 가닥 표적 프로모터 RNA 분자의 형성을 초래한다 (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). 표적 프로모터는 이러한 수단에 의해 불활성화될 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 식물 세포 및 본 발명에 따른 식물에서의 시클린 SDS 유사 단백질의 활성 감소는 또한, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 프로모터 서열의 이중 가닥 RNA 분자를 식물 세포 또는 식물 내로 도입함으로써 달성될 수 있다. 이와 관련하여, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 프로모터 DNA 분자의 "역위 반복 서열"은 바람직하게는, 식물의 게놈 내로 도입되며, 여기서 전사될 표적 프로모터 DNA 분자 (시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 프로모터)는 이러한 표적 프로모터 DNA 분자의 발현을 제어하는 프로모터의 제어 하에 있다.

[0284] 센스 및 안티센스 RNA 분자의 동시 발현 (RNAi 기술)을 통하여 유전자의 발현을 억제하기 위해서, 예를 들어, 임의의 기준의 플랭킹 서열을 포함한, 시클린 SDS 유사 단백질에 대한 전체 코딩 서열을 포함하는 DNA 분자 뿐만 아니라 이러한 코딩 서열의 일부만을 포함함으로써 이들 일부가 세포에서 소위 RNAi 효과를 생성시키기에 충분히 길어야만 하는 DNA 분자를 사용할 수 있다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 일부는 코딩 서열, 비-번역된 하류 또는 상류 서열, 인트론, 프로모터 및/또는 인핸서로부터 선택될 수 있다. 일반적으로, 20 bp (또는 뉴클레오티드)의 최소 길이, 바람직하게는 적어도 25 bp (또는 뉴클레오티드), 특히 바람직하게는 적어도 50 bp (또는 뉴클레오티드)의 최소 길이를 갖는 서열이 적합하다. 예를 들어, 상기 DNA 분자는 20 내지 25 bp (또는 뉴클레오티드), 바람직하게는 26 내지 50 bp (또는 뉴클레오티드), 특히 바람직하게는 50 bp (또는 뉴클레오티드) 초과의 길이를 갖는다.

[0285] 식물 세포에서 발생하는 내인성 서열과의 고도의 동일성을 가지며 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 사용하는 것이 또한, 센스 및 안티센스 RNA 분자의 동시 발현 (RNAi 기술)에 적합하다. 최소 동일성은 약 65% 초과, 바람직하게는 80% 초과여야 한다. 적어도 90%, 특히 95% 내지 100%의 동일성을 갖는 서열을 사용하는 것이 특히 바람직해야 한다. 서열식별번호: 1 하에 제시된 핵산 서열에 의해 포함된 핵산 서열의 연속 연장물을 함유하는 서열이, RNAi 기술을 통하여 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자를 억제하는데 특히 적합하다.

[0286] 본 발명에 따른 식물 세포 및 본 발명에 따른 식물에서, 또는 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법에서 시클린 SDS 유사 단백질의 활성 감소는 혼성체 RNA-DNA 올리고뉴클레오티드 ("키메라플라스트")를 식물 세포 내로 도입시키는, 소위 "생체내 돌연변이유발"에 의해 달성될 수 있다 (Kipp,

P.B. et al., Poster Session at the "5<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, 21st-27th September 1997, Singapore; R. A. Dixon and C.J. Arntzen, meeting report on "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; 국제 특허 출원 WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et al., 1999, PNAS 96, 8774-8778).

[0287] RNA-DNA 올리고뉴클레오티드의 DNA 구성성분의 일부분은 내인성 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 핵산 서열과 상동이지만, 내인성 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 핵산 서열과 비교하여 돌연변이를 갖거나 또는 상동 영역에 의해 둘러싸인 이종 영역을 함유한다. RNA-DNA 올리고뉴클레오티드의 상동 영역과 내인성 핵산 분자를 염기쌍 형성한 다음, 상동 재조합함으로써, RNA-DNA 올리고뉴클레오티드의 DNA 구성성분에 함유된 돌연변이 또는 이종 영역을 식물 세포의 게놈 내로 전이시킬 수 있다. 이로써 하나 이상의 시클린 SDS 유사 단백질의 활성 감소가 초래된다.

[0288] 본 발명에 따른 식물 세포 및 본 발명에 따른 식물에서, 또는 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법에서 시클린 SDS 유사 단백질의 활성 감소는 시클린 SDS 유사 단백질의 길항제/억제제를 코딩하는 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입함으로써 달성될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 시클린 SDS 유사 단백질의 비-기능적인 유도체, 특히 트랜스 우성 돌연변이물의 발현에 의해, 및/또는 이러한 단백질의 길항제/억제제의 발현에 의해 상기 시클린 SDS 유사 단백질의 활성 감소를 달성할 수 있다는 것을 알고 있다. 이러한 단백질의 길항제/억제제는, 예를 들어 항체, 항체 단편, 또는 유사한 결합 특징을 지닌 분자를 포함한다. 예를 들어, 세포질성 scFv 항체를 사용하여, 유전적으로 변형된 담배 식물에서의 피토크롬 A 단백질의 활성을 조정하였다 (Owen, Bio/Technology 10 (1992), 790-4; Review: Franken, E, Teuschel, U. and Hain, R., Current Opinion in Biotechnology 8, (1997), 411-416; Whitelam, Trends Plant Sci. 1 (1996), 268-272; Conrad and Manteufel, Trends in Plant Science 6, (2001), 399-402; De Jaeger et al., Plant Molecular Biology 43, (2000), 419-428). 특이적 항체를 발현시킴으로써 감자 식물에서 분자 효소의 활성을 감소시키는 것이 문헌 [Jobling et al. (Nature Biotechnology 21, (2003), 77-80)]에 기재되어 있다. 여기서는, 상기 항체에 색소체 표적 서열을 제공하여, 색소체에 국재된 단백질의 억제를 보장하도록 하였다.

[0289] 본 발명에 따른 식물 세포 및 본 발명에 따른 식물에서, 또는 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법에서 시클린 SDS 유사 단백질의 활성 감소는 트랜스포손 서열을 포함하는 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입함으로써 달성될 수 있다. 트랜스포손 서열을 내인성 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 서열 내로 삽입하는 것은 내인성 시클린 SDS 유사 단백질의 발현에서의 저하를 가져올 것이다.

[0290] 트랜스포손은 내인성 트랜스포손일 수 있고 (식물에 대해 상동임), 또한 상기 세포에서 자연적으로 발생되지 않지만 (식물에 대해 이종임), 각각의 경우에 유전 공학 방법, 예컨대 예를 들어, 세포의 형질전환을 통하여 식물 세포 또는 식물 내로 도입되어야 하는 것이다. 트랜스포손을 통하여 유전자의 발현을 변화시키는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 식물 생명 공학에서의 도구로서 내인성 및 이종 트랜스포손을 사용하는 것에 관한 개요가 문헌 [Ramachandran and Sundaresan (2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252)]에 제시된다. 특이적 유전자를 트랜스포손 삽입 돌연변이유발에 의해 불활성화시켰던 돌연변이를 확인할 수 있는 가능성이 문헌 [Maes et al. (1999, Trends in Plant Science 4 (3), 90-96)]의 개요에 제시된다. 내인성 트랜스포손의 도움으로 벼 돌연변이체를 생성하는 것이 문헌 [Hirochika (2001, Current Opinion in Plant Biology 4, 118-122)]에 기재된다. 내인성 레트로트랜스포손의 도움으로 옥수수 유전자를 확인하는 것이, 예를 들어, 문헌 [Hanley et al. (2000, The Plant Journal 22 (4), 557-566)]에 제시된다. 레트로트랜스포손의 도움으로 돌연변이체를 제조할 수 있는 가능성 및 돌연변이체의 확인 방법이 문헌 [Kumar and Hirochika (2001, Trends in Plant Science 6 (3), 127-134)]에 기재된다. 상이한 종에서 기술적 (인공) 트랜스포손의 활성이 쌍자엽 식물과 단자엽 식물 둘 다에 대하여 기재되어 있으며: 예를 들어, 벼 (Greco et al., 2001, Plant Physiology 125, 1175-1177; Liu et al., 1999, Molecular and General Genetics 262, 413-420; Hiroyuki et al., 1999, The Plant Journal 19 (5), 605-613; Jeon und Gynheung, 2001, Plant Science 161, 211-219), 보리 (2000, Koprek et al., The Plant Journal 24 (2), 253-263), 아라비돕시스 탈리아나 (*Arabidopsis thaliana*) (Aarts et al., 1993, Nature 363, 715-717, Schmidt und Willmitzer, 1989, Molecular and General Genetics 220, 17-24; Altmann et al., 1992, Theoretical and Applied Genetics 84, 371-383; Tissier et al., 1999, The Plant Cell 11, 1841-1852), 토마토 (Belzile und Yoder, 1992, The Plant Journal 2 (2), 173-179) 및 감자 (Frey et al., 1989, Molecular and General Genetics 217, 172-177;

Knapp et al., 1988, Molecular and General Genetics 213, 285-290)에 대하여 기재되어 있다.

[0291] 기본적으로, 본 발명에 따른 식물 세포 및 본 발명에 따른 식물은 상동 및 이종 트랜스포손 둘 다의 도움으로 생산될 수 있다.

[0292] 본 발명과 연계해서, 본 발명에 따른 식물 세포 및 식물은 또한, 소위 삽입 돌연변이유발의 사용에 의해 생산될 수 있다 (개요 문헌 [Thorneycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601]). 본 발명에 따른 식물 세포 및 본 발명에 따른 식물에서, 또는 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법에서 시클린 SDS 유사 단백질의 활성 감소는 T-DNA 서열을 포함하는 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입함으로써 달성될 수 있다.

[0293] T-DNA 삽입 돌연변이유발은 아그로박테리움(*Agrobacterium*)으로부터의 Ti 플라스미드의 특정의 절편 (T-DNA)이 식물 세포의 게놈 내로 통합될 수 있다는 사실에 근거한다. 식물 염색체에서의 통합 장소는 규정되지 않지만, 어떠한 지점에서도 일어날 수 있다. T-DNA가 유전자 기능을 구성하는 염색체의 일부분 내로 통합되는 경우, 이로써 유전자 발현 상의 변화가 초래될 수 있으므로, 이는 관련 유전자에 의해 코딩된 단백질의 활성 상의 변화를 초래할 수도 있다. 특히, T-DNA가 단백질의 코딩 영역 내로 통합되면 종종, 상응하는 단백질이 관련 세포에 의해 더 이상 전혀 합성될 수 없게 되거나, 또는 더 이상 활성 형태로 합성될 수 없게 된다. 돌연변이체를 생성하기 위하여 T-DNA 삽입을 사용하는 것이, 예를 들어, 아라비돕시스 탈리아나 (Krysan et al., 1999, The Plant Cell 11, 2283-2290; Atipiroz-Leehan and Feldmann, 1997, Trends in genetics 13 (4), 152-156; Parinov and Sundaresan, 2000, Current Opinion in Biotechnology 11, 157-161) 및 벼 (Jeon and An, 2001, Plant Science 161, 211-219; Jeon et al., 2000, The Plant Journal 22 (6), 561-570)에 대하여 기재된다. T-DNA 삽입 돌연변이유발의 도움으로 생성되었던 돌연변이체의 확인 방법이, 특히 문헌 [Young et al., (2001, Plant Physiology 125, 513-518), Parinov et al. (1999, The Plant cell 11, 2263-2270), Thorneycroft et al. (2001, Journal of Experimental Botany 52, 1593-1601), and McKinney et al. (1995, The Plant Journal 8 (4), 613-622)]에 기재된다.

[0294] T-DNA 삽입 돌연변이체가, 예를 들어, 아라비돕시스 탈리아나에 대하여 다수로 생성되었으며, 이는 상이한 컬쳐 컬렉션 ("스톡 센터", 예를 들어 솔크 연구소 게놈 분석 실험실 (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory; 캘리포니아주 92037 라 졸라 엔. 토레이 파인스 로드 10010: <http://signal.salk.edu/>)에 의해 입수 가능하다.

[0295] T-DNA 돌연변이유발은 기본적으로, 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 갖는 본 발명에 따른 식물 세포 및 식물의 생산에 적합하다.

[0296] 본 발명과 연계해서, 용어 "외래 핵산 분자"는 상응하는 야생형 식물 세포 또는 식물에서 자연적으로 발생하지 않거나, 또는 야생형 식물 세포 또는 식물 내의 실체가 있는 공간 배열에서 자연적으로 발생하지 않거나, 또는 식물 세포 또는 식물의 게놈 내의 특정 장소 (이 장소에서는 자연적으로 발생되지 않음)에 국재되는 상기 핵산 분자를 의미하는 것으로 이해된다. 바람직하게는, 외래 핵산 분자는 상이한 요소로 이루어지는 재조합 분자이며, 그의 조합 또는 특이적 공간 배열은 식물 세포 또는 식물에서 자연적으로 발생되지 않는다.

[0297] 원칙적으로, 외래 핵산 분자는 시클린 SDS 유사 단백질의 활성에서의 감소를 일으키는 임의의 핵산 분자일 수 있다. 이러한 종류의 핵산 분자가 상기 본원에 기재되어 있다.

[0298] 본 발명과 연계해서, 용어 "게놈"은 식물 세포에 존재하는 유전 물질의 전체를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 세포 핵 뿐만 아니라 다른 구획 (예를 들어 색소체, 미토콘드리아)이 또한 유전 물질을 함유하는 것으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.

[0299] DNA를 식물 숙주 세포 내로 도입하기 위한 수많은 기술이 이용가능하다. 이들 기술은 형질전환 매질로서 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 또는 아그로박테리움 리조게네스(*Agrobacterium rhizogenes*)를 사용하여 식물 세포를 T-DNA로 형질전환시키는 것, 원형질체의 융합, 핵산의 주사, 핵산의 전기 천공, 바이오리스틱(biolistic) 접근법에 의한 핵산의 도입 뿐만 아니라 다른 가능성은 포함한다.

[0300] 식물 세포의 아그로박테리아 매개된 형질전환의 사용이 집중적으로 연구되어 왔고, EP 120516; 문헌 [Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Albllasserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 and by An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287]에 충분히 기재되어 있다. 감자의 형질전환에 관해서는, 예를 들어 문헌 [Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33]

참조.

- [0301] 아그로박테리움 형질전환에 근거한 벡터를 통한 단자엽 식물의 형질전환이 또한 기재되어 있다 (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al., Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner and Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al., Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). 단자엽 식물의 형질전환에 대한 대체 시스템은 바이오리스틱 접근법에 의한 형질전환 (Wan and Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), 원형질체 형질전환, 부분적으로 투과시킨 세포의 전기천공 및 유리 섬유에 의한 DNA의 도입이다. 특히, 옥수수의 형질전환이 문헌에 수차례 기재되어 있다 (예를 들어, WO95/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435; 문헌 [Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726] 참조). 다른 유형의 곡류, 예를 들어 보리 (상기 문헌 [Wan and Lemaux] 참조; 상기 문헌 [Ritala et al.] 참조; 문헌 [Krens et al., Nature 296, (1982), 72-74]) 및 밀 (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297; Becker et al., 1994, Plant Journal 5, 299-307)의 성공적인 형질전환이 또한 기재되어 있다. 상기 방법 모두가 본 발명의 프레임워크 내에서 적합하다. 채소 작물의 형질전환이 또한 관련 기술분야에 통상적으로 공지되어 있다. 다른 것 외에 문헌 [Curtis (2012, Springer Science & Business Media, ISBN: 1402023332, 9781402023330)]에는, 커피, 파인애플, 배, 무, 당근, 완두, 양배추, 콜리플라워 및 수박의 형질전환 방법이 개시된다. 바나나, 감귤류, 망고, 파파야, 수박, 아보카도, 포도, (스위트) 멜론, 키위, 커피, 카카오와 같은 채소 작물의 형질전환이 문헌 [Pua and Davey (2007, Springer Science & Business Media, ISBN: 3540491619, 9783540491613)]에 기재되어 있다.
- [0302] 유전자 침묵 효과를 부여하는 것 또는 돌연변이를 식물 세포 또는 식물 내의 대립유전자 내로 도입하기 위해 사용되는 것과 같은 핵산 분자를 발현시키기 위하여, 이를 핵산은 바람직하게는, 식물 세포에서의 전사를 개시시키는 것 (프로모터)을 포함한, 조절 DNA 서열과 연결된다. 이와 동시에, 식물 발달의 특정 단계에서 또는 외부의 영향에 의해 결정된 시간에, 발현이 구성적으로 또는 특정의 조직에서만 일어나도록 프로모터를 선택할 수 있다. 프로모터는 식물과 핵산 분자 둘 다에 대해 상동 또는 이종일 수 있다. 따라서 핵산 분자는 통상적으로, 식물에서 자연적으로 발생하는 것이 아니고, 재조합 핵산 분자이며, 이는 핵산 분자에 의해 포함된 상이한 유전적 요소 (예를 들어 코딩 서열, RNAi 상보적 서열, 프로모터)의 조합이 자연에서는 이러한 조합으로 존재하지 않는다는 것을 의미한다.
- [0303] 적합한 프로모터, 예를 들어, 구성적 발현을 위한 옥수수로부터의 유비퀴틴 프로모터 및 콜리플라워 모자이크 바이러스의 35S RNA의 프로모터, 감자에서 괴경 특이적 발현을 위한 파타틴(patatin) 프로모터 B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29), 또는 광합성적으로 활성인 조직에서의 발현만을 보장하는 프로모터, 예를 들어 ST-LS1 프로모터 (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451), 또는 밀로부터의 HMG 프로모터의 내배유 특이적 발현을 위한, USP 프로모터, 파세올린(phaseolin) 프로모터, 옥수수로부터의 제인 유전자의 프로모터 (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026; Quattroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93), 글루텔린 프로모터 (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4 (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383 (1996), 213-218) 또는 shrunken-1 프로모터 (Werr et al., EMBO J. 4 (1985), 1373-1380)가 관련 기술분야에 통상적으로 공지되어 있다. 그러나, 외부의 영향에 의해 결정된 시간에만 활성화되는 프로모터가 사용될 수도 있다 (예를 들어 WO 9307279 참조). 단순한 유도를 가능하게 하는 열 쇼크 단백질의 프로모터가 여기에 특히 관심이 있을 수 있다. 더욱이, 종자 특이적 프로모터, 예컨대 비시아 파바(*Vicia faba*) 및 다른 식물에서의 종자 특이적 발현을 보장해 주는, 비시아 파바로부터의 USP 프로모터를 사용할 수 있다 (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Baeumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467).
- [0304] 재조합 핵산 분자는 또한, 폴리-A 미부를 전사체에 부가하기 위해 사용되는 종결 서열 (폴리아데닐화 시그널)을 함유할 수 있다. 전사체의 안정화 기능은 폴리-A 미부에 따른 결과로 간주된다. 이러한 유형의 요소가 문헌 ([Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29] 참조)에 기재되며, 이는 자유로이 교환될 수 있다.
- [0305] 인트론 서열이, 예를 들어 프로모터와 코딩 영역 사이에 존재할 수도 있다. 이러한 인트론 서열은 식물에서의 발현의 안정성과 증가된 발현을 초래할 수 있다 (Callis et al., 1987, Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrs et al., 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 459-467).

and Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93; Rethmeier, et al., 1997; Plant Journal. 12(4): 895-899; Rose and Beliakoff, 2000, Plant Physiol. 122 (2), 535-542; Vasil et al., 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; XU et al., 2003, Science in China Series C Vol.46 No.6, 561-569). 적합한 인트론 서열은, 예를 들어, 옥수수로부터의 *sh1* 유전자의 제1 인트론, 옥수수로부터의 폴리유비퀴틴 유전자 1의 제1 인트론, 벼로부터의 *epsps* 유전자의 제1 인트론, 또는 아라비돕시스로부터의 PAT1 유전자의 2개의 제1 인트론 중 하나이다.

[0306] 특정 식물이 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 유전자 또는 대립유전자 또는 핵산 서열 내에 돌연변이를 갖는지를 검증하는 것에 관하여 본원에 기재된 것, 및 본 발명에 따른 식물의 생산 방법을 위하여 식물을 성장시키고/재배하는 것에 대하여 본원에 기재된 것이 또한, 외래 핵산 분자를 본 발명에 따른 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 방법에 적용가능하다.

[0307] 본 발명의 추가 실시양태에서 본 발명에 따른 식물의 생산 방법 및 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법은 본 발명에 따른 방법 각각에서 단계 d)로부터 수득된 식물로부터 추가 식물을 생산하는 것으로 이루어진 추가 단계를 포함한다. 생산된 추가 식물은, 이들 식물이 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 적어도 하나의 돌연변이체 대립유전자를 포함한다는 것 또는 이들 식물이 상기 본원에 기재된 바와 같은 외래 핵산 분자의 도입으로 인해 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 가진다는 것을 특징으로 한다. 이들 추가 식물은 영양 (무성생식적) 또는 생식력있는 (유성생식적, 유성) 생식을 통해 생산될 수 있다. 영양 번식에 적합한 것은, 예를 들어, 커팅, 시험관내 조직, 세포, 원형질체, 배아 또는 캘러스 배양물, 미세번식, 균경 또는 괴경이다. 다른 번식 재료는, 예를 들어, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성 또는 동형접합성인 과실, 종자, 모종 등을 포함한다.

[0308] 식물의 미세번식을 포함한, 영양 (무성생식적) 번식을 위한 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 바나나, 감귤류, 망고, 파파야, 아보카도, (스위트) 멜론에 대해 기재된 기술이 문헌 [Pua and Davey (2007, Springer Science & Business Media, ISBN: 3540491619, 9783540491613)]에 기재되어 있다. 문헌 [Sultana and Rhaman (2012, LAP Lambert Academic Publishing, ISBN-13: 978-3-8484-3937-9)]에는, 예를 들어 수박에 대한 다양한 조직 배양과 미세번식 방법이 개시된다.

[0309] 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한/수득된 식물이 또한, 본 발명의 실시양태이다.

[0310] 본 발명의 추가 실시양태는 하기 단계를 포함하는, 씨없는 과실 생산 식물의 번식 방법에 관한 것이다:

[0311] a) 종자로부터 본 발명에 따른 식물이 성장하는 것인 종자를 수득하거나 또는 수탁 번호 NCIMB 42532 하에 기탁된 종자 또는 그의 자손을 수득하는 단계,

[0312] b) 단계 a)에서 수득된 종자로부터 식물을 성장시키는 단계,

[0313] c) 단계 b) 하에 성장된 식물로부터 씨없는 과실 생산 식물을 선별하는 단계,

[0314] d) 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의해 단계 c) 하에 선별된 식물을 번식시키는 단계:

[0315] i) 단계 c) 하에 선별된 식물의 부분을 또 다른 뿌리줄기와 접목시키는 것,

[0316] ii) 단계 c) 하에 선별된 식물의 부분을 시험관내 조직 배양물에서 재배하고, 임으로 상기 조직 배양물로부터 새로운 식물을 재생시키는 것,

[0317] iii) 임의로, 단계 c) 하에 선별된 식물의 부분로부터 배아 또는 캘러스 배양물을 생산하고, 임의로 조직 배양물로부터 새로운 식물을 재생시키는 것,

[0318] iv) 임의로, 미세번식 기술에 의해 추가 식물을 생산하는 것.

[0319] 접목과 번식에 의한 식물 부분의 번식, 및 임의로, 조직 배양 방법에 의한 식물의 재생이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 방법은 다양한 과학 간행물에 기재되고, 예를 들어, 문헌 [Smith (2012, Academic Press, ISBN-13: 978-0124159204), Gayatri & Kavyashree (2015, Alpha Science International Ltd, ISBN-13: 978-1842659618)]과 같은 수많은 과학책에 고찰 및 요약되어 있다. 수박의 경우, 각각의 방법이, 예를 들어 문헌 [Sultana and Rhaman (2012, LAP Lambert Academic Publishing, ISBN-13: 978-3848439379)]에 기재되어 있다.

[0320] 본 발명에 따른 씨없는 과실 생산 식물의 번식 방법에 의해 수득가능한/수득된 식물 또는 식물 부분이 또한, 본

발명의 실시양태이다.

[0321] 본 발명의 추가 실시양태에서, 본 발명에 따른 식물의 모든 생산 방법, 또는 임의로, 본원에 개시된 본 발명에 따른 씨없는 과실 생산 식물의 번식 방법이 본 발명에 따른 식물의 생산에 사용된다.

[0322] 본 발명의 추가 실시양태는 본 발명에 따른 식물의 번식 재료, 및/또는 본 발명에 따른 식물 세포를 포함하는 식물의 번식 재료 또는 식물의 생산을 위한 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한/수득된 식물의 번식 재료 또는 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한/수득된 식물의 번식 재료 또는 본 발명에 따른 씨없는 과실 생산 식물의 번식 방법에 의해 임의로 수득가능한 식물로부터 수득가능한/수득된 식물의 번식 재료에 관한 것이다. 본 발명의 구체적으로 포함된 실시양태는 수탁 번호 NCIMB 42532 하에 기탁된 종자로부터 수득가능한/수득된 식물의 번식 재료, 바람직하게는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성 또는 동형접합성인 수탁 번호 NCIMB 42532 하에 기탁된 종자로부터 수득가능한/수득된 식물의 번식 재료이다. 또한 본 발명에 의해 포함되는 것은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성 또는 동형접합성인 식물의 번식 재료이며, 여기서 이러한 번식 재료는 기탁 수탁 번호 NCIMB 42532의 종자로부터 수득된 식물을 또 다른 식물과 교배함으로써 유래되는 식물로부터 수득되고/수득가능하다.

[0323] 여기서, 용어 "번식 재료"는 영양 (무성생식적) 또는 생식력있는 생식 (유성생식적, 유성적) 경로를 통하여 자손을 생성하는데 적합한 식물의 구성성분을 포함한다. 영양 번식에 적합한 것은, 예를 들어, 커팅, 시험관내 조직, 세포, 원형질체, 배아 또는 캘러스 배양물, 미세번식 방법, 균경 또는 괴경이다. 다른 번식 재료는, 예를 들어, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성인 과실, 종자, 모종 등을 포함한다. 번식 재료는 한 측면에서, 예를 들어 또 다른 뿌리줄기와의 접목에 의해 번식되는 커팅, 또는 시험관내 조직 배양 물질, 특히 배아 배양물의 형태를 취한다. 특히 바람직한 것은 시험관내 조직 배양 물질, 특히 시험관내 배아 배양물 형태의 번식 재료이다. 영양 번식에 의해 생산된 식물이 본원에서 영양 번식된 식물로서 지칭되기도 한다. 특히, 돌연변이체 시클린 SDS 유사 대립유전자가 동형접합성 형태로 존재하는 식물이 바람직하게는, 영양 번식된다 (그의 과실에 씨가 없기 때문임).

[0324] 본 발명의 추가 실시양태는 본 발명에 따른 식물의 부분, 및/또는 본 발명에 따른 식물 세포를 포함하는 식물의 부분 또는 식물의 생산을 위하여 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한/수득된 식물의 부분 또는 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한/수득된 식물의 부분 또는 본 발명에 따른 씨없는 과실 생산 식물의 번식 방법에 의해 임의로 수득가능한 식물로부터 수득가능한/수득된 식물의 부분에 관한 것이다. 본 발명의 추가로 포함된 실시양태는 수탁 번호 NCIMB 42532 하에 기탁된 종자 (또는 그의 자손)로부터 수득가능한/수득된 식물의 부분, 바람직하게는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성 또는 동형접합성인 수탁 번호 NCIMB 42532 하에 기탁된 종자 (또는 그의 자손)로부터 수득가능한/수득된 식물의 식물 부분에 관한 것이다. 또한 본 발명에 의해 포함되는 것은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성 또는 동형접합성인 식물의 식물 부분이며, 여기서 이러한 식물 부분은 기탁 수탁 번호 NCIMB 42532의 종자로부터 수득된 식물을 또 다른 식물과 교배함으로써 유래되는 식물로부터 수득되고/수득가능하다.

[0325] 본 발명의 추가 실시양태는 밭 또는 온실 (예를 들어, 유리 온실, 터널 또는 그물집)에서 본 발명에 따른 식물을 성장시키고/시키거나 본 발명에 따른 식물 세포를 포함하는 식물을 성장시키거나 또는 본 발명에 따른 식물의 생산 방법에 의해 수득가능한/수득된 식물을 성장시키거나 또는 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한/수득된 식물의 과실을 성장시키거나 또는 본 발명에 따른 씨없는 과실 생산 식물의 번식 방법에 의해 임의로 수득된/수득가능한 식물로부터 수득가능한/수득된 식물을 성장시키는 단계, 식물이 수분될 수 있도록 하는 단계, 및 씨없는 과실을 수확하는 단계를 포함하는, 씨없는 과실의 생산 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 본 발명에 따른 씨없는 과실의 생산 방법에서 성장한 식물은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성이다.

[0326] 놀랍게도, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 동형접합성 상태로 포함하는 식물을 상이한 식물로부터의 꽃가루로 수분시키면, 씨없는 과실을 생산하는 식물이 초래될 것이란 사실이 밝혀졌다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 식물의 암술머리가 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 꽃가루에 의해 수분되는지 아니면 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 야생형 대립유전자를 포함하는 꽃가루에 의해 수분되는지는 결정적이지 않다. 어떠한 경우에도, 꽃가루의 유전자형과는 독립적으로, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립

유전자에 대해 동형접합성인 자성 식물이 씨없는 과실을 생산할 것이다. 심지어 야생형 식물로부터의 꽃가루에 의해 타가 수분된 경우에도, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 본 발명에 따른 식물이 씨없는 과실을 생산할 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 식물을 재배하는 경우에는, 어떠한 경우에도 씨없는 과실이 수득될 것이다.

[0327] "온실"은 본 발명과 연계해서, 유리, 플라스틱, 폴리에틸렌, 거즈, 망 등으로 이루어진 투명한 재료의 지붕과 벽이 있는, 식물을 성장시키기 위해 사용된 빌딩 또는 구획을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 온실은 난방, 냉각, 음영, 자동 급수, 수정, 이산화탄소 농도 조정 등을 위한 추가의 기술 장비를 가질 수 있거나 또는 가지지 않을 수 있다. 임의의 형태의 기술 장비를 수반한 온실이 본원에 사용된 바와 같은 용어 "온실"에 포함될 것이다.

[0328] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본 발명에 따른 식물로부터 수득가능한/수득된 과실, 및/또는 본 발명에 따른 식물 세포를 포함하는 과실 또는 식물의 생산을 위한 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한/수득된 식물의 과실 또는 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한/수득된 식물의 과실 또는 씨없는 과실 생산 식물을 번식시키기 위한 본 발명에 따른 방법에 의해 수득된/수득가능한 식물로부터 수득가능한/수득된 식물의 과실 또는 씨없는 과실의 생산을 위한 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한/수득된 과실에 관한 것이다. 본 발명의 추가로 포함된 실시양태는 수탁 번호 NCIMB 42532 하에 기탁된 종자 (또는 그의 자손)로부터 수득가능한/수득된 식물의 과실, 바람직하게는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성 또는 동형접합성인 수탁 번호 NCIMB 42532 하에 기탁된 종자 (또는 그의 자손)로부터 수득가능한/수득된 식물의 과실에 관한 것이다. 또한 본 발명에 의해 포함되는 것은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성 또는 동형접합성인 과실이며, 여기서 이러한 과실은 기탁 수탁 번호 NCIMB 42532의 종자로부터 수득된 식물을 또 다른 식물과 교배함으로써 유래되는 식물로부터 수득되고/수득가능하다. 과실은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성일 수 있고 씨 보유 과실을 생산하거나, 또는 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 대립유전자에 대해 동형접합성일 수 있고 씨없는 과실을 생산한다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 대립유전자에 대해 이형접합성인 과실이, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 식물을 번식시키는데 사용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 과실은 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성이고/이거나 씨없는 과실을 생산한다. 논리적인 이유로 씨없는 과실은 이러한 과실로부터 추가의 식물을 성장시키는데 적격이지 않다. 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 번식시키는데 적격이지 않거나 또는 번식될 수 없거나 또는 번식되지 않는 씨없는 과실인 본 발명에 따른 과실에 관한 것이다.

[0329] 본 발명의 추가 실시양태는 씨없는 과실을 생산하는 식물의 생산을 위한, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산 분자의 용도에 관한 것이다:

[0330] a) 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 12 또는 서열식별번호: 19 또는 서열식별번호: 20 하에 제공된 아미노산 서열을 수반한 단백질을 코딩하는 핵산 분자;

[0331] b) 단백질의 서열이 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 12 또는 서열식별번호: 19 또는 서열식별번호: 20 하에 제공된 아미노산 서열과의 적어도 58% 또는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90% 또는 특히 바람직하게는 적어도 95%의 동일성을 갖는 것인 단백질을 코딩하는 핵산 분자;

[0332] c) 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 3 또는 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 17 하에 제시된 뉴클레오티드 서열 또는 상보적 서열을 포함하는 핵산 분자;

[0333] d) c) 하에 기재된 핵산 서열과의 적어도 58% 또는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90% 또는 특히 바람직하게는 적어도 95%의 동일성을 갖는 핵산 분자;

[0334] e) 염격한 조건 하에 a), b), c), 또는 d) 하에 기재된 핵산 분자의 적어도 하나의 가닥과 혼성화하는 핵산 분자;

[0335] f) 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열이 유전 코드의 변성으로 인해 a) 또는 b) 하에 확인된 핵산 분자의 서열로부터 벗어나는 것인 핵산 분자; 및

[0336] g) a), b), c) 또는 d) 하에 확인된 핵산 분자의 단편, 대립유전자성 변이체 및/또는 유도체를 나타내는 핵산

분자.

- [0337] 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산 분자의 용도의 바람직한 실시양태에서, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산 분자가 본 발명에 따른 식물의 생산을 위해 사용되고, 특히 바람직한 실시양태에서, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산 분자가 본 발명에 따른 씨없는 과실을 생산하는 식물의 생산을 위해 사용된다.
- [0338] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산 분자가 본 발명에 따른 식물 부분 또는 본 발명에 따른 과실의 생산을 위해 사용된다.
- [0339] 추가의 바람직한 실시양태에서 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산 분자가 본원에 개시된 본 발명의 방법 중 임의의 것에서 사용된다. 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산 분자는, 예를 들어, 식물의 생산을 위한 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있거나, 또는 외래 핵산 분자를 식물 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있거나, 또는 본 발명에 따른 씨없는 과실 생산 식물을 번식시키기 위한 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있거나, 또는 씨없는 과실의 생산을 위한 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있다.
- [0340] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 식물 세포 또는 식물이 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는지를 확인하거나, 또는 식물 세포 또는 식물이 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 갖는지를 확인하기 위해 사용된다. 바람직하게는 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 씨없는 과실 생산 식물이 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는지를 확인하거나, 또는 식물이 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 돌연변이체 mRNA를 합성하는지를 확인하거나, 또는 식물 세포 또는 식물이 시클린 SDS 유사 단백질의 감소된 활성을 갖는지를 확인하기 위해 사용된다. 이러한 식물을 확인할 수 있는 방법이 상기 본원에 기재되어 있으며 따라서 이에 적용가능하다.
- [0341] 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 관한 바람직한 실시양태가 상기 본원에 기재되어 있으며 따라서 본 발명에 따른 용도에 적용가능하다.
- [0342] 한 측면에서, 게놈 내에 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 종자, 식물 또는 식물 부분, 또는 이러한 종자, 식물 또는 식물 부분으로부터의 DNA를 확인 및/또는 선별하기 위한 스크리닝 방법이 제공된다.
- [0343] 이러한 방법은 상기 돌연변이체 대립유전자의 존재를 검출하기 위하여, 공지된 방법을 사용하여 DNA, RNA (또는 cDNA) 또는 단백질 수준으로 스크리닝하는 것을 포함한다. 특정 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 존재를 검출하는 많은 방법이 있다.
- [0344] 예를 들어, 야생형과 돌연변이체 대립유전자 간에 단일 뉴클레오티드 차이 (단일 뉴클레오티드 다형성; SNP)이 존재한다면, SNP 유전자형결정 검정을 사용하여 식물 또는 식물 부분 또는 세포가 게놈 내에 야생형 뉴클레오티드를 포함하는지 아니면 돌연변이체 뉴클레오티드를 포함하는지의 여부를 검출할 수 있다. 예를 들어, SNP는 KASP-검정 ([kpbioscience.co.uk](http://kpbioscience.co.uk) 하의 월드 와이드 웹 참조) 또는 다른 SNP 유전자형결정 검정을 사용하여 용이하게 검출될 수 있다. KASP-검정을 개발하기 위하여, 예를 들어 SNP의 70개 염기쌍 상류 및 70개 염기쌍 하류를 선택할 수 있고, 2개의 대립유전자 특이적 정방향 프라이머와 1개의 대립유전자 특이적 역방향 프라이머를 설계할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Allen et al. 2011, Plant Biotechnology J. 9, 1086-1099] 참조, 특히 KASP-검정 방법에 대해서는 상기 문헌의 p097-1098 참조.
- [0345] 동등하게 다른 유전자형결정 검정을 사용할 수 있다. 예를 들어, TaqMan SNP 유전자형결정 검정, 고 해상도 용융 (HRM) 검정, SNP-유전자형결정 어레이 [예를 들어 플루이다임(Fluidigm), 일루미나(Illumina) 등] 또는 DNA 서열분석을 동등하게 사용할 수 있다.
- [0346] 이배체 식물 또는 식물 부분 (세포, 잎, DNA 등)의 유전자형결정은 SNP 유전자형을 구별할 수 있으며, 예를 들어 서열식별번호: 1의 뉴클레오티드 1687에 대한 CC (야생형 뉴클레오티드에 대해 동형접합성임)를 포함하는 식물 또는 부분은 그의 게놈 내에 서열식별번호: 1의 뉴클레오티드 1687에 대한 CT (돌연변이체 뉴클레오티드에 대해 이형접합성임)를 포함하는 식물 또는 부분과 구별될 수 있다. 사배체 식물 또는 식물 부분 (세포, 잎, DNA 등)의 유전자형결정은, 예를 들어 KASP-검정을 사용하여 이배체에 대해서와 동일한 방식으로 수행하여 SNP 유전자형을 구별할 수 있으며, 예를 들어 서열식별번호: 1의 뉴클레오티드 1687에 대한 CCCC (야생형 뉴클레오티드에 대해 동형접합성임)를 포함하는 식물 또는 부분은 그의 게놈 내에 SNP에 대한 다른 유전자형, 예를 들어 CCCA, CCAA 등을 포함하는 식물 또는 부분과 구별될 수 있다. 삼배체에 대해서도 동일하게 적용된다. 또한 다

른 다배수체에 대해서도 동일하게 적용된다.

[0347] 상기 방법의 바람직한 측면에서, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자의 적어도 하나의 카페를 포함하는 식물, 식물 세포 및 식물 부분은 수박 식물, 특히 재배된 수박, 예를 들어 이배체, 사배체 또는 삼배체 재배된 수박이다.

[0348] 수박 식물은 육종 계통 또는 품종일 수 있다. 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자는 임의의 재배된 수박에서 생성될 수 있거나, 또는 (예를 들어 NCIMB 42532 하에 기탁된 종자 또는 그의 자손으로부터) 임의의 재배된 수박 내로 도입되어, SDS 유사 단백질의 돌연변이체 대립유전자를 바람직하게는 동형접합성 형태로 포함하는 계통 또는 품종을 생산할 수 있다. 재배된 수박은 다양한 과실 크기 (예를 들어 WO2012069539에 기재된 바와 같은 매우 작은 크기, 예를 들어, 0.9 kg 미만 또는 심지어 0.65 kg 이하; 약 3 내지 7 파운드, 즉 약 1.4 내지 3.2 kg의 개인적 크기; 약 6 내지 12 파운드, 즉 약 2.7 내지 5.5 kg의 아이스 박스 크기; 및 35 파운드 이하, 즉 약 15.9 kg의 더 큰 크기), 과육 색상, 및 과실 모양 및 상이한 껍질 색상을 생산한다. 따라서 돌연변이체 대립유전자는 육종에 의해 임의의 과실 모양 (예를 들어 길쭉한, 타원형, 타원형의 길쭉한, 둥툭한, 둥툭하고 길쭉한, 구형 또는 둥근), 과실 표면 (예를 들어 고랑, 매끄러움), 과육 색상 (예를 들어 적색, 암적색, 스칼렛 레드, 붉은 산호색, 오렌지색, 담홍색 또는 분홍색, 황색, 카나리아 황색 또는 백색), 껍질 색상 (예를 들어 연녹색; 암녹색; 녹색의 좁은 줄무늬, 중간 줄무늬 또는 넓은 줄무늬; 회색 유형; 반점이 있거나 없음; 황금색; 진홍색 유형 껍질, 주빌레 유형 껍질; 올스위트 유형 껍질; 흑색/암녹색), 껍질 두께, 껍질 감촉, 껍질 패턴 (예를 들어 줄무늬, 비-줄무늬, 그물 모양), 과육 구조 / 과육 견고성, 리코펜 및/ 또는 비타민 함량, 상이한 당 대 산의 비, 매우 우수한 과실 향미 등을 생산하는 재배된 수박 내로 도입될 수 있다. 문헌 [Guner and Wehner 2004, Hort Science 39(6): 1175-1182] 참조, 특히 과실 특징에 관한 유전자를 설명하는 1180-1181면 참조. 일반적으로 중요한 육종 목적은 조기 숙성, 높은 과실 수확량, 높은 내부 과실 품질 (우수한 균일한 색상, 높은 당, 적절한 당 대 산 비, 우수한 향미, 높은 비타민과 리코펜 함량, 견고한 과육 질감, 비-섬유질 과육 질감; 공동병, 껍질 괴사, 배꼽 썩음병 또는 십자수와 같은 결함이 없음; 및 우수한 껍질 특징 및 내균열성)이다. 상기 계통 또는 품종에 의해 생산된 과실이 바람직하게는 시장성있는 과실이다. 한 측면에서 평균 브릭스는 적어도 6.0, 7.0, 8.0 또는 적어도 9.0, 바람직하게는 적어도 10.0, 보다 바람직하게는 적어도 11.0 이상이다.

[0349] 과실 색상은 임의의 색상, 예컨대 적색, 암적색, 스칼렛 레드, 붉은 산호색, 오렌지색, 담홍색, 분홍색, 적분홍색, 황색, 카나리아 황색 또는 백색일 수 있다. 바람직하게는 과육 색상은 균일하다.

#### 기탁 정보

[0351] 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 돌연변이체 대립유전자에 대해 분리되는 식물의 이배체 시트룰루스 라나투스 종자는 부다페스트 조약하에 2016년 1월 27일자로 눈햄 베.파우.(Nunhems B.V.)에 의해 NCIMB 리미티드 (NCIMB Ltd.; 스코틀랜드 벅스번 애버딘 AB21 9YA)에 수탁 번호 NCIMB 42532 하에 기탁되었다. 이러한 종자 기탁에 대하여, 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 대립유전자가 *emb1*로 지명되었다. 전문적인 해결책이 적용된다.

[0352] 상기 기탁된 종자는 *emb1* 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 식물과 *emb1* 야생형 대립유전자에 대해 동형접합성인 식물과의 자가 수분된 역교배로부터 수득되었다. 따라서 기탁된 종자의 25%가 *emb1* 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성이고 씨없는 과실을 생산하며, 50%가 돌연변이체 대립유전자에 대해 이형접합성이고 25%가 야생형 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩하는 야생형 대립유전자에 대해 동형접합성이다.

[0353] 기탁물에 대한 접근권은 요청 시 그에 대한 권리가 있다고 특히 상표청장에 의해 결정된 사람에게 본 출원의 계류 동안 이용가능할 것이다.

[0354] 37 C.F.R. § 1.808(b)에 따라, 하나 이상의 기탁물에 대한 대중의 이용가능성에 대해 기탁자가 부과한 모든 제한은, 기탁물에 대한 접근권을 부여함으로써 특히 부여 시 취소 불가능하게 제거될 것이다. 기탁물은 30년의 기간 동안, 또는 가장 최근의 요청 후 5년의 기간 동안, 또는 특히의 집행가능 기간 중 더 긴 기간 동안 유지될 것이며, 그 기간 동안 계속 살아남지 못할 경우에 대체될 것이다. 출원인은 본 출원에 대해 본 특허 하에 부여되거나 또는 식물 품종 보호법 (7 USC 2321 이하 참조) 하에 부여된 어떠한 권리도 포기하지 않는다.

#### 서열 설명

[0356] 서열식별번호: 1: 시트룰루스 라나투스로부터의 야생형 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 게놈 서열.

- [0357] 서열식별번호: 2: 시트룰루스 라나투스로부터의 SDS 유사 단백질의 아미노산 서열. 이러한 아미노산 서열은 서열식별번호: 1의 코딩 서열로부터 유래될 수 있다.
- [0358] 서열식별번호: 3: 시트룰루스 라나투스로부터의 시클린 SDS 유사 단백질의 돌연변이체 대립유전자의 mRNA 서열.
- [0359] 서열식별번호: 4: SDS 유사 단백질의 돌연변이체 대립유전자의 아미노산 서열. 이러한 아미노산 서열은 서열식별번호: 3으로부터 유래될 수 있다.
- [0360] 서열식별번호: 5: 쿠쿠미스 멜로로부터의 야생형 시클린 SDS 유사 단백질 코딩 유전자의 핵산 서열.
- [0361] 서열식별번호: 6: 쿠쿠미스 멜로로부터의 SDS 유사 단백질의 아미노산 서열. 이러한 아미노산 서열은 서열식별번호: 5의 코딩 서열로부터 유래될 수 있다.
- [0362] 서열식별번호: 7: PCR 및/또는 서열분석 반응에서 프라이머 (A4532)로서 사용된 인공 서열.
- [0363] 서열식별번호: 8: PCR 및/또는 서열분석 반응에서 프라이머 (A4533)로서 사용된 인공 서열.
- [0364] 서열식별번호: 9: PCR 및/또는 서열분석 반응에서 프라이머 (A4534)로서 사용된 인공 서열.
- [0365] 서열식별번호: 10: PCR 및/또는 서열분석 반응에서 프라이머 (A4535)로서 사용된 인공 서열.
- [0366] 서열식별번호: 11: PCR 및/또는 서열분석 반응에서 프라이머 (A4538)로서 사용된 인공 서열.
- [0367] 서열식별번호: 12: 쿠쿠미스 사티부스로부터의 SDS 유사 단백질의 아미노산 서열.
- [0368] 서열식별번호: 13: 도 2의 샘플 114 및 115의 서열.
- [0369] 서열식별번호: 14: 도 2의 샘플 114 및 115의 서열.
- [0370] 서열식별번호: 15: 도 2의 샘플 116 및 117의 서열.
- [0371] 서열식별번호: 16: 도 2의 샘플 116 및 117의 서열.
- [0372] 서열식별번호: 17: 뉴클레오티드 670 내지 671에 정지 코돈을 초래하는, 뉴클레오티드 670에서 C에서 T로의 돌연변이를 포함하는 수박 돌연변이체 시클린 SDS 유사 유전자의 cDNA 서열.
- [0373] 서열식별번호: 18: 서열식별번호: 17의 cDNA에 의해 코딩된 수박 돌연변이체 시클린 SDS 유사 단백질.
- [0374] 서열식별번호: 19: 솔라눔 리코페르시쿰으로부터의 야생형 SDS 유사 단백질의 아미노산 서열.
- [0375] 서열식별번호: 20: 카시쿰 안눔으로부터의 야생형 SDS 유사 단백질의 아미노산 서열.
- [0376] 도면의 설명
- [0377] 도 1: 야생형 식물로부터의 수박 과실 (1A), EMB1 돌연변이체 식물로부터의 과실과 비교한 야생형 식물 (1B), EMB1 돌연변이체 식물로부터의 씨없는 과실의 슬라이스 (1C) 및 EMB1 돌연변이체 식물의 열린 배아 없는 씨 (1D).
- [0378] 도 2: 샘플 번호 114, 115, 116 및 117에 대해 수득된 서열들을 비교하는 서열 정렬. 상단 우측의 숫자는 서열식별번호: 1 하에 제시된 상응하는 서열 내에서의 뉴클레오티드 위치를 표시한다. 샘플 번호 116 및 117은 EMB1 돌연변이체 식물로부터 수득된다. 샘플 번호 114 및 115는 야생형 식물로부터 수득된다.
- [0379] 도 3: 폴리아크릴아미드 겔 상에서 샘플 번호 114, 115, 116 및 117의 cDNA로부터 수득된 PCR 산물의 전기영동 분석. 샘플 번호 114 및 115는 야생형 식물로부터 수득된다. 샘플 번호 116 및 117은 EMB1 돌연변이체 식물로부터 수득된다.
- [0380] 일반적 방법
- [0381] 1. RNA의 단리
- [0382] 어린 씨방 조직을 작은 조각이 되도록 커팅하고, 액체 질소에서 동결시키며, 추가로 사용할 때까지 -80°C 하에 저장하였다. 이와 같이 동결된 조직 조각을 액체 질소 중에서 피스톤과 모르타르를 이용하여 분말로 분쇄하여 이러한 분말을 동결된 상태로 유지시킨다. 100 mg의 분말을 사용하여, 제조업자의 프로토콜에 따라서 식물 RNA 단리용 키트 (RNeasy 식물 미니 키트; 큐아젠(Qiagen))를 사용하여 전체 RNA를 단리하였다.

[0383] 2. cDNA의 제조

[0384] 상기 RNA를 DNase (TURBODNA-프리; 앰비온(Ambion))로 처리하고, 0.9  $\mu$ g RNA를 제조업자의 프로토콜 (아이스 크립트(iScript) cDNA 합성 키트; 바이오라드(BioRad))에 따라서 역전사에 사용하였다.

[0385] 3. cDNA 상에서의 PCR

[0386] PCR은 0.2 mM dNTP, 0.4  $\mu$ l 파이어 핫 스타트(Phire Hot Start) II DNA 폴리머라제 (써모 피셔 사이언티픽 (Thermo Fisher Scientific)), 각각의 프라이머 0.25  $\mu$ M 및 0.4  $\mu$ l cDNA 혼합물을 함유하는 20  $\mu$ l의 총 용적의 완충액 (파이어 반응 완충액; 써모 피셔 사이언티픽)에서 수행되었다. 90°C 하에 30분의 초기 변성 단계 후, 98°C 하에 10초, 60°C 하에 15초 및 72°C 하에 30초의 40주기를 수행하였고, 72°C 하에 3분으로 반응을 완결시켰다.

[0387] 4. 서열분석

[0388] QIAxcel 어드밴스트 시스템 (퀘이아젠)을 사용하여 PCR 산물 크기를 분석하였고, PCR 반응 혼합물을 서비스 제공자에게 보내어 서열분석하도록 하였다 (베이스클리어(BaseClear; 네덜란드)).

[0389] 실시예

[0390] 1. 씨없는 과실 돌연변이체의 단리

[0391] 근친 교배 계통 (WMZD0048TY; 하기에 TYY로 약칭됨)으로부터의 대략 10,000개의 수박 종자를 EMS로 수시간 동안 처리한 다음, 연속해서 이러한 종자를 30분 동안 줄줄 흐르는 수돗물에서 세척함으로써 돌연변이체 집단을 확립시켰다. 그 후, 상기 종자를 토양에 파종할 때까지 젖은 상태로 유지하였다. 자가 수분된, 돌연변이유발된 종자로부터 M1 식물을 성장시켰고, 종자 (M2 세대)를 수확하였다. 3,000개의 M2 계열 각각으로부터의 8개 종자를 파종하여 성장시켰고, 씨없는 과실을 생산하는 돌연변이체 식물을 단리하였다. 이들 돌연변이체 식물 중 하나가 EMB1로 지명되었다. EMB1 돌연변이체 식물의 번식은 EMB1 돌연변이체 식물의 커팅을 비-돌연변이유발된 수박 식물의 뿌리줄기에 접목함으로써 수행되었다.

[0392] 2. 씨없는 과실 표현형의 확증

[0393] EMB1 돌연변이체를, EMB1 돌연변이체 (BC1 세대)로부터의 꽃가루를 사용하여 본래의 비-돌연변이유발된 수박 TYY 근친 교배 계통과 역교배시켰다. 자가 수분된 BC1 세대로부터 성장한 식물의 25%가 씨없는 과실을 생산하였다.

[0394] EMB1 돌연변이체로부터의 꽃가루를 또한, 매핑 집단을 확립하기 위하여 상이한 수박 근친 교배 계통과 교배시키는데 사용하였다. 매핑 집단의 자가 수분된 식물의 25%가 씨없는 과실을 생산하였다.

[0395] EMB1 돌연변이체로부터의 꽃가루를 사용하여 다른 근친 교배 계통을 수정시킨 각각의 역교배 및 교배로부터의 결과는 EMB1 돌연변이체의 꽃가루가 가임성이라는 것을 명백하게 입증한다.

[0396] 추가의 교배에서는 *emb1* 돌연변이체 대립유전자에 대해 동형접합성인 EMB1 돌연변이체 식물을 자성 부모로서 사용하였고, 다양한 상이한 다른 계통으로부터의 꽃가루로 수분시켰다. 이들 교배 각각으로부터의 식물 100%가 씨없는 과실을 생산하였다.

[0397] 상이한 교배로부터 수득된 결과는 *emb1* 돌연변이가 단일 열성 대립유전자에 기인한다는 것을 보여준다. 이러한 결과는 또한, 씨 생산 식물로부터의 꽃가루를 사용하여 EMB1 돌연변이체 식물을 수정시키는 경우에 씨없는 과실 표현형이 유지된다는 것을 입증한다. 따라서 이러한 씨없는 과실 표현형은 EMB1 돌연변이체의 일탈적인 꽃가루에 기인하는 것이 아니지만, 배아 발달에서의 결함에 배정될 수 있다.

[0398] 3. 씨없는 과실 표현형을 유발하는 유전자의 확인

[0399] 상이한 수박 근친 교배 계통을 EMB1 돌연변이체 식물로부터의 꽃가루로 수분시킴으로써 확립된 매핑 집단을 분석하였고, 서열식별번호: 1 하에 제시된 게놈 서열에서 단일 핵 다형성 (SNP)을 검출하였다. 서열식별번호: 1은 야생형 대립유전자의 서열을 나타낸다. EMB1 돌연변이체 식물의 각각의 대립유전자에서는, 서열식별번호: 1 내의 위치 번호 2185 하에서의 뉴클레오티드 구아닌 (G)이 아데닌 (A)에 의해 대체된다.

[0400] 4. *emb1* 대립유전자로부터 전사된 mRNA의 분석

[0401] 밭에서 성장한 식물로부터 상이한 크기의 꽂눈을 수확하였다. 샘플 번호 114 및 115는 돌연변이유발에 사용되

었던, TYY로 지명된 원래의 근친 교배 계통의 식물로부터의 꽃눈이다. 따라서 TYY는 야생형 *emb1* 대립유전자를 포함하는 야생형 식물을 나타낸다. 샘플 번호 115 및 116은 돌연변이체 *emb1* 대립유전자를 포함하는 씨없는 과실 생산 EMB1 돌연변이체 식물로부터의 꽃눈이다. 각각의 샘플 번호에 대하여 수확되고 분석된 표현형, 물질에 관한 개요가 표 1에 제공된다.

샘플 번호	식물 샘플 명칭	수집된 조직	표현형
114	TYY (101)	꽃눈 1 mm	야생형 씨 보유 과실
115	TYY (102)	꽃눈 3-4 mm	야생형 씨 보유 과실
116	EMB1 (103)	꽃눈 1 mm	씨없는 과실
117	EMB1 (104)	꽃눈 3-4 mm	씨없는 과실

[0402]

표 1

[0403]

상이한 샘플 번호의 꽃눈으로부터 RNA를 단리하였다. 각각의 샘플 번호에 대한 700 ng RNA를 cDNA 합성에 사용하였다. 수득된 각각의 cDNA 샘플 상에서, 프라이머 A4532 (서열식별번호: 7) 및 A4533 (서열식별번호: 8)을 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. 이들 프라이머는 서열식별번호: 1에 표시된 코딩 서열의 *emb1* 대립유전자의 일부를 증폭시키도록 설계되었다. PCR 산물을 도 3에 도시되는 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분석하였다. 도 3 으로부터, 샘플 번호 116 및 117이 다른 모든 샘플 번호보다 더 짧은 PCR 단편을 생성시켰다는 것이 명백하게 추론될 수 있다. 이는 *emb1* 돌연변이체 대립유전자의 mRNA가 샘플 번호 114 및 115에서 상응하는 야생형 대립유전자와 비교하여 뉴클레오티드의 결실을 포함한다는 것을 명확하게 표시하였다.

[0404]

##### 5. *emb1* 대립유전자의 cDNA 서열 분석

[0405]

서열식별번호: 7 하에 제시된 프라이머 A4532, 서열식별번호: 11 하에 제시된 프라이머 A4538, 서열식별번호: 9 하에 제시된 프라이머 A4534 및 서열식별번호: 10 하에 제시된 프라이머 A4535를 사용하여 샘플 번호 114, 115, 116 및 117의 cDNA를 서열분석하였다. 각각의 샘플 번호 116 및 117로부터 수득된 서열이 mRNA 문자로서 서열식별번호: 3 하에 제시된다. 각각의 샘플 번호 114 및 115로부터 수득된 서열은 서열식별번호: 1에 표시된 코딩 서열과 동일하다. 샘플 번호 114, 115, 116 및 117로부터 수득된 서열들을 비교한 결과, 각각의 샘플 번호 116 및 117의 서열이 각각의 샘플 번호 114 및 115의 서열과 비교하여 16개의 연속되는 뉴클레오티드의 결실을 갖는 것으로 나타났다. 또한, 각각의 샘플 번호 116 및 117의 서열은 각각의 샘플 번호 114 및 115의 서열과 비교하여, 코딩 서열 내에 조기 정지 코돈을 유발하는 프레임 시프트를 갖는다. 관련된 서열 부분의 정렬이 도 2에 제시된다.

[0406]

샘플 번호 116 및 117의 *emb1* 돌연변이체 대립유전자가, 샘플 번호 114 및 115의 야생형 대립유전자로부터 전사된 mRNA와 비교하여 결실, 리딩 프레임 내에서의 프레임 시프트 및 조기 정지 코돈을 갖는 mRNA로 전사되는 것으로 결론지었다. 또한, 도 2로부터, 샘플 번호 116 및 117의 *emb1* 돌연변이체 대립유전자로부터 전사된 mRNA가, 샘플 번호 114 및 115의 야생형 대립유전자로부터 전사된 mRNA에 의해 코딩된 단백질과 비교하여 8개의 아미노산이 교환되는 단백질을 코딩한다는 것을 알 수 있다.

[0407]

##### 6. 또 다른 수박 돌연변이체 식물의 생성

[0408]

시클린 SDS 유사 유전자 서열을 알게 됨으로써, SDS 유사 유전자에서의 다른 돌연변이체 대립유전자를 생성시키는 것이 가능해졌다. EMS 돌연변이가 특정 아미노산 코딩 코돈을 정지 코돈으로 전환시킬 수 있었던 도메인 상에 설계된 프라이머를 사용하여, EMS 돌연변이유발된 TILLING 집단을 스크리닝하였다.

[0409]

정방향 프라이머: CGAAGAGAAAGGATTAGACGTTG (서열식별번호: 21)

[0410]

역방향 프라이머: TCTGAGCAGTCAGTATCAGACG (서열식별번호: 22).

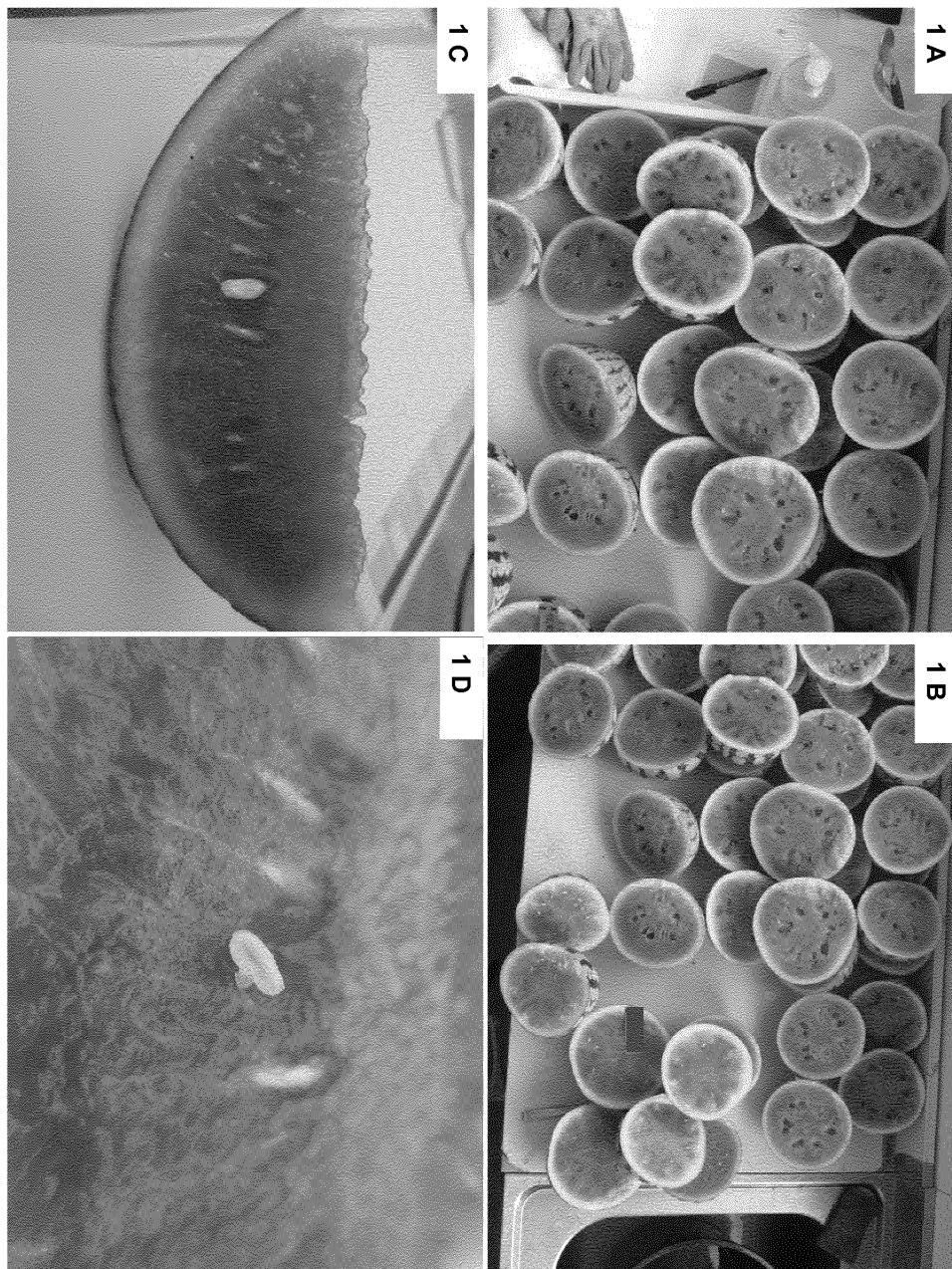
[0411]

돌연변이체 시클린 SDS 유사 대립유전자를 포함하는 식물을 확인하였다. 이와 같이 확인된 대립유전자는 정지

코돈을 초래하는, 서열식별번호: 1의 뉴클레오티드 1687에서의 단일 뉴클레오티드 대체를 포함한다. 따라서, 상기 돌연변이체 대립유전자는 서열식별번호: 2의 야생형 단백질의 아미노산 1 내지 223만을 포함하는 말단절단된 시클린 SDS 유사 단백질을 코딩한다. 돌연변이체 대립유전자의 cDNA가 서열식별번호: 17에 제공되고, 돌연변이체 대립유전자에 의해 코딩된 말단절단된 단백질이 서열식별번호: 18에 제공된다.

## 도면

### 도면1

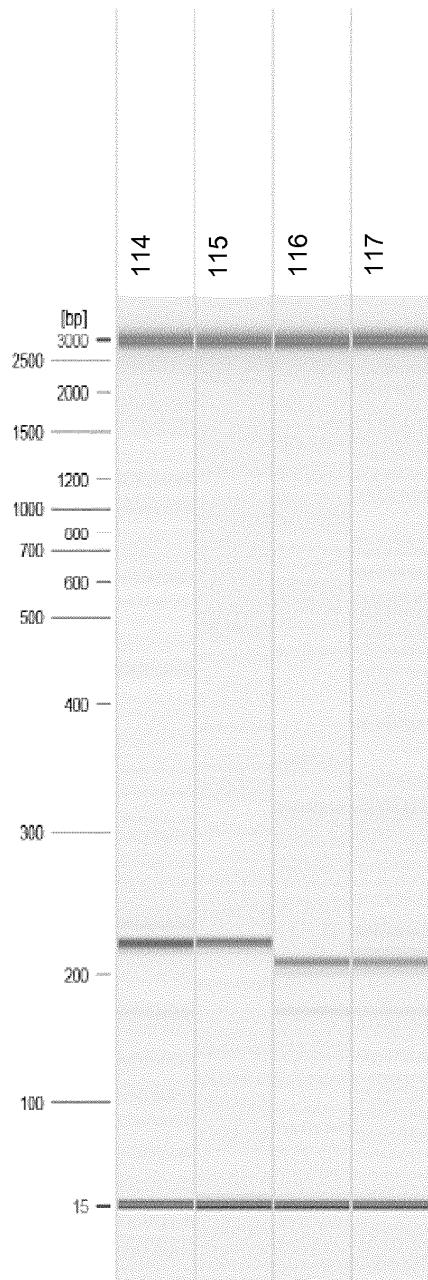


도면2

2232

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

## 도면3



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; NUNHEMS B. V.

&lt;120&gt; Seedless fruit producing plants

&lt;130&gt; BCS 16-8014

&lt;150&gt; EP16171462.1

&lt;151&gt; 2016-05-26

&lt;160&gt; 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5135

<212> DNA

<213> Citrullus lanatus

<220><221> exon

<222> (1018)..(2088)

<220><221> CDS

<222> (1018)..(2088)

<220><221> Intron

<222> (2089)..(2185)

<220><221> exon

<222> (2186)..(2353)

<220><221> CDS

<222> (2186)..(2353)

<220><221> Intron

<222> (2354)..(3098)

<220><221> exon

<222> (3099)..(3265)

<220><221> CDS

<222> (3099)..(3265)

<220><221> Intron

<222> (3266)..(4324)

<220><221> exon

<222> (4325)..(4607)

<220><221> CDS

<222> (4325)..(4604)

<400> 1

aaacattcat actttgaag aaaatttagta tattattat ttatattata tttacagatt	60
atttattgat tatttttaa atatttattg aatttttat aatataataa aaatgtcgac	120
atgtcaacac aaaattaatt tcattattatg aattagaagt aggaaataag agtatgttg	180
gaataaaattt tcaagtattn aatttaaaa ataagtact tcaaaagaaa tataagtgtt	240

tggcaaccac tcaaactgta tttaaaagc cattagtgtc tttattataa atactttct	300
---	-----

tatcaaaagt	gtttaaatga	aaataaaaagt	ttgaagacat	ttctttctca	ggtaatcga	360
atggcttcta	aatttaagat	ttatcaaatg	tatatggtat	gttggttca	aaagagttt	420
tgagcttata	attaaagaac	atcaatctca	tgacttatca	atttttgtat	atgtgtat	480
aaaaaaaaaa	agaaataaaa	aagaaaaaaga	aaagaaaaac	attttgtat	aggacciac	540
aattaaacaa	tttaggacat	gtctagggag	tgattctaaa	atagttaat	ccactttgt	600
tattattgaa	atcacttta	aatattcaa	atcttccaaa	cacaaaattt	attatataaa	660
aattataactt	aaaaatgtaa	aattaaatac	taaattaatt	tggagtgatt	taatatatgt	720
tttgggata	tatccatttc	aaaatcactc	caaatatgaa	tttcataaaaa	ttaaagtgt	780
atattigaaa	gtagaagact	aaaatggaaa	agaatataga	ggtgaggggc	caaaatgata	840
tttaactaaa	taattattat	tatatttag	attagcacga	gaggaggtga	cagtgaggga	900
ccctctccaa	aaaaaaaaaa	aactcacttc	caattcacaa	ttctcttttgc	ttctctaact	960
tccataactg	ctctgcttgc	catcacgaaa	ctcatctca	tcttcttcat	tcgaaca	1017
atg aag tcc	aag aag cca	agg gca	aat ccc aaa	ccc gaa tcc	tac tac tct	1065
Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser						
1	5	10	15			
ccg ccg aag aag	ctc cgt tct	cag ctt cca	cgg cgcc	aga cgcc	tct	1113
Pro Pro Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Ser						
20	25	30				
cggtt att tct cct ttt ttc tgc tcc ttg gac tcc	gat tcc cct	gct cct				1161
Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro						
35	40	45				
tct acc acc att gct ttt gct tct tcc ttt gct	gcc gcc	gaa tcc				1209
Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser						
50	55	60				
agc tcc act tcc ttc cac gca ggc gga cct gag	gtt tct agc cag	ctc				1257
Ser Ser Thr Ser Phe His Ala Gly Gly Pro Glu Val Ser Ser Gln Leu						
65	70	75	80			
aac gcg tgt ttt gga ttc cag agg ccg aat ttg	cgg aag aga cga	ttt				1305
Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe						
85	90	95				
gggtcg ggt ggt aat ttg gat gaa gtt tcg aag	aag gag gtt	gga				1353

Gly Ser Gly Val Asn Leu Asp Glu Val Ser Lys Lys Glu Val Gly  
 100 105 110  
 gta ggg agt aat gtg gaa gtg tct gaa tcg tct tgc gtt gaa tca aat 1401

Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn  
 115 120 125  
 tct gga gtt gat ttt ggt gtt ctc gga cca agc act agc tcc agg ttg 1449  
 Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Leu Gly Pro Ser Thr Ser Ser Arg Leu  
 130 135 140  
 aag att aga agt gat ttt agg aga act att gac gaa aat gaa gat cca 1497  
 Lys Ile Arg Ser Asp Phe Arg Arg Thr Ile Asp Glu Asn Glu Asp Pro  
 145 150 155 160  
 atc gat caa gcg gat aat gga gtt gtg aag ttt caa ttg acg gat gct 1545  
 Ile Asp Gln Ala Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Gln Leu Thr Asp Ala  
 165 170 175  
 gat gtc tcg tcg aag ctt tgt gaa aag gga gct gtg cca ctc act cct 1593  
 Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Glu Lys Gly Ala Val Pro Leu Thr Pro  
 180 185 190  
 tgt gga gag tct tgc gct gag tct atc ttc cag agc gtt tgt tcg ttc 1641  
 Cys Gly Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe  
 195 200 205  
 gaa gag aaa gga tta gac gtt gaa gaa aac aga cta tgg gaa ttt cag 1689  
 Glu Glu Lys Gly Leu Asp Val Glu Glu Asn Arg Leu Trp Glu Phe Gln  
 210 215 220  
 tta cca gaa cta ccg aga aat gag atc aat gaa act ttc act gtt tcg 1737

Leu Pro Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ile Asn Glu Thr Phe Thr Val Ser  
 225 230 235 240  
 aag tcg gat tcg acg ata gaa cag tgg cct aat agc ttg aag ttt gaa 1785  
 Lys Ser Asp Ser Thr Ile Glu Gln Trp Pro Asn Ser Leu Lys Phe Glu  
 245 250 255  
 tcg gat ctt gct tcg acg gag caa ttc tct tat gag aat gtt tcg gaa 1833

Ser Asp Leu Ala Cys Thr Glu Gln Phe Ser Tyr Glu Asn Val Ser Glu

260	265	270	
tac tct agc cag gcg ttg tcc gag ctt caa tca aca att cta ttg gag			1881
Tyr Ser Ser Gln Ala Leu Ser Glu Leu Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu			
275	280	285	
acg tct gat act gac tgc tca gat tac act cct tca att ttt ttg gaa			1929
Thr Ser Asp Thr Asp Cys Ser Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Phe Leu Glu			
290	295	300	
tcc gga agc gaa ttt tca gag aaa tcg aac gac gca gct cct tcg			1977
Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Asp Asp Ala Ala Pro Ser			
305	310	315	320
tca aca ttt agc atg ttg ctg cag tac aga cgc gac ttt cta aac tta			2025
Ser Thr Phe Ser Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Asn Leu			
325	330	335	
aat gcc tct cca gac atc aga act agc tcg tct att gaa gaa gag aaa			2073
Asn Ala Ser Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Ser Ile Glu Glu Glu Lys			
340	345	350	
gta gat caa tct acg gtaattcgct atcttcatgc ttcccttgacg tttcatttgc			2128
Val Asp Gln Ser Thr			
355			
aacaaacctg aagctaatac aacaactata tatatatatt atttgatttt aaattag			2185
att ttg aga ttt gaa gaa ttg gac gat gaa gaa gcc tat cta atg ttc			2233
Ile Leu Arg Phe Glu Glu Leu Asp Asp Glu Glu Ala Tyr Leu Met Phe			
360	365	370	
aga agt aga gaa aga cgc caa ttg att att cgc gac tac gta gag gag			2281
Arg Ser Arg Glu Arg Arg Gln Leu Ile Ile Arg Asp Tyr Val Glu Glu			
375	380	385	
tat cgg tcc aca acg gat tat ggc gat ctc att ctc cag caa cgg tca			2329
Tyr Arg Ser Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Leu Ile Leu Gln Gln Arg Ser			



aactcgta gtagatgaa tattgcttga aaacaaactg tatgccagtt ggtcttcttg	3415
tttcgatcca agggagtgaa attgggttaag ttaggatcga atgctaagta gtactagaaa	3475
taataatcag aaagaattgt attaaagtaa ttgaatctaa tagtctgaa tattttct	3535
aaagtccaaa gtgtcgagcc tgaaagctt gcgttacat ggaccaaagt aatgttgtga	3595

atatatcgta ggtccttta tagcaattat gtaacaata atagccatac attagtgtcg	3655
atacacacca cccgtacggt actgttagtcg aatattgcca taacactatc tttcagttct	3715
tatgtaaca attcatgtgc acagaagaga cccgagaccc accaagaaaa cattatctt	3775
gacttgtata tagaactcta agtcgagtca aatgtaaaac aattctttt cttctttct	3835
ctttctcaaa cticctttt tagccttcat ttatcttga ctigcaattt acatgcaaaa	3895
tgttaataa ttgtgatttg ttaattaaa taggcctt gtaattgaga aggtatccaa	3955
gctagctggt gggctcgag cttggtgat atattataa agctatgata ggactgattt	4015

gttttatttt tggcatttc agggtgcagc aaaggaatat ccgtgttagag agcaacacgt	4075
acagaagatc tgaagttgtt ggcatttgcgat ggcttgcatttga agaagtcattt aagttccatt	4135
gtttcttgcc aactgtttac aacttcttat ggtacatctt ccttgacta acttgaccat	4195
tggtgggaag gaaaaagtt ttcccttcg tgcatttcattt tcataataac tcctccccc	4255
cattaaacaat ttgaatctac tgcataaac atgctttattt taattttttt ttttggaaaa	4315
ttatcttag g ttc tac ctg aaa gct gct gga gct gac tcg aat ttg gag	4364

Phe Tyr Leu Lys Ala Ala Gly Ala Asp Ser Asn Leu Glu

470	475	480	
aat cga gct aag aac ttt gcg gag ctg gtt ctt tca gac aaa gtc caa			4412
Asn Arg Ala Lys Asn Phe Ala Glu Leu Val Leu Ser Asp Lys Val Gln			

485	490	495	
ttt tgt tat ttc cct tca act att gca gct gcg gtt gtc atc ttg gcg			4460
Phe Cys Tyr Phe Pro Ser Thr Ile Ala Ala Val Val Ile Leu Ala			

500	505	510	
-----	-----	-----	--

tcc cta gga gaa aaa caa gat gca cca agt caa cga gtc att gag gta	4508		
Ser Leu Gly Glu Lys Gln Asp Ala Pro Ser Gln Arg Val Ile Glu Val			
515	520	525	530
cat aaa tac aaa tac ctg tta gag aga aaa ctc ctt tat ctt tat att	4556		
His Lys Tyr Lys Tyr Leu Leu Glu Arg Lys Leu Leu Tyr Ile			
535	540	545	

gac cca att gaa caa ata aac aag tat ttt gaa atc gag aag aaa ctt 4604

Asp Pro Ile Glu Gln Ile Asn Lys Tyr Phe Glu Ile Glu Lys Lys Leu

550 555 560

taa agtttacaa aaacaccata atctaaatcc aatttagattc aactgtaatg 4657

ttaagtacaa taataaaaata catataccat aaggaaatgg taggttatag tgttgttc 4717

aatttagatat tcaatttata tattagttag tgttgttaat ctccctgaat atttcttact 4777

aacttgagga aggtctcctg tcttctggaa acccctccat gcccaaatt tcagcctct 4837

gctattccca ttaagtcaaa catgtaatga gtttacttt ctttctccctt ctaatttatta 4897

attatttta ataatttatt tgtctaattc atttctgta gtctgaaccc acgaacttgc 4957

ttatcacaaa atccaaaacc aaaaacccca tcacaattt ggaatctt ttgagaactg 5017

ctactataac catgtaattt cttcaaaaat ctacaaaaat agaaataaca cttatTTAGA 5077

ctatctgtgg tactatctca taacatctgg tgcattgtgg ctttgcagac gcatgtca 5135

<210> 2

<211> 562

<212> PRT

<213> Citrullus lanatus

<400> 2

Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser

1 5 10 15

Pro Pro Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Ser

20 25 30

Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro

35 40 45

Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser

50 55 60

Ser Ser Thr Ser Phe His Ala Gly Gly Pro Glu Val Ser Ser Gln Leu

65 70 75 80

Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe

85 90 95

Gly Ser Gly Gly Val Asn Leu Asp Glu Val Ser Lys Lys Glu Val Gly

100 105 110

Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn

115 120 125

Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Leu Gly Pro Ser Thr Ser Ser Arg Leu

130 135 140

Lys Ile Arg Ser Asp Phe Arg Arg Thr Ile Asp Glu Asn Glu Asp Pro

145 150 155 160

Ile Asp Gln Ala Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Gln Leu Thr Asp Ala

165 170 175

Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Glu Lys Gly Ala Val Pro Leu Thr Pro

180 185 190

Cys Gly Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe

195 200 205

Glu Glu Lys Gly Leu Asp Val Glu Glu Asn Arg Leu Trp Glu Phe Gln

210 215 220

Leu Pro Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ile Asn Glu Thr Phe Thr Val Ser

225 230 235 240

Lys Ser Asp Ser Thr Ile Glu Gln Trp Pro Asn Ser Leu Lys Phe Glu

245 250 255

Ser Asp Leu Ala Cys Thr Glu Gln Phe Ser Tyr Glu Asn Val Ser Glu

260 265 270

Tyr Ser Ser Gln Ala Leu Ser Glu Leu Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu

275 280 285

Thr Ser Asp Thr Asp Cys Ser Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Phe Leu Glu

290 295 300

Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Asp Asp Ala Ala Pro Ser

305 310 315 320

Ser Thr Phe Ser Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Asn Leu

325 330 335

Asn Ala Ser Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Ser Ile Glu Glu Glu Lys

340 345 350

Val Asp Gln Ser Thr Ile Leu Arg Phe Glu Glu Leu Asp Asp Glu Glu

355                    360                    365

Ala Tyr Leu Met Phe Arg Ser Arg Glu Arg Arg Gln Leu Ile Ile Arg

370                    375                    380

Asp Tyr Val Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Leu Ile

385                    390                    395                    400

Leu Gln Gln Arg Ser Asn Val Val Gln Trp Ile Val Glu Arg Ser Arg

405                    410                    415

Asp Ser Lys Leu His Gln Glu Thr Thr Phe Leu Gly Val Thr Leu Leu

420                    425                    430

Asp Gln Ile Leu Ser Arg Gly Phe Phe Lys Ala Gly Arg His Leu Gln

435                    440                    445

Ile Leu Gly Ile Ala Cys Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ile Glu Glu Asn

450                    455                    460

Gln Ser Tyr Ser Trp Phe Tyr Leu Lys Ala Ala Gly Ala Asp Ser Asn

465                    470                    475                    480

Leu Glu Asn Arg Ala Lys Asn Phe Ala Glu Leu Val Leu Ser Asp Lys

485                    490                    495

Val Gln Phe Cys Tyr Phe Pro Ser Thr Ile Ala Ala Val Val Ile

500                    505                    510

Leu Ala Ser Leu Gly Glu Lys Gln Asp Ala Pro Ser Gln Arg Val Ile

515                    520                    525

Glu Val His Lys Tyr Lys Tyr Leu Leu Glu Arg Lys Leu Leu Tyr Leu

530                    535                    540

Tyr Ile Asp Pro Ile Glu Gln Ile Asn Lys Tyr Phe Glu Ile Glu Lys

545                    550                    555                    560

Lys Leu

<210> 3

<211> 1673

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Induced by mutation

&lt;220&gt;&lt;221&gt; mRNA

&lt;222&gt; (1)..(1673)

&lt;220&gt;&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1098)

&lt;400&gt; 3

aug aag ucc aag aag cca agg gca aau ccc aaa ccc gaa ucc uac ucu 48

Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser

1 5 10 15

ccg ccg aag aag aag cuc cgu ucu cag cuu cca cgg cgc aga cgc ucu 96

Pro Pro Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Ser

20 25 30

cgg auu ucu ccu uuu uuc ugc ucc uug gac ucc gau ucc ccu gcu ccu 144

Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro

35 40 45

ucu acc acc auu gcu uuu gcu ucu ucc uuu gcu gcc gcc gaa ucc 192

Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser

50 55 60

agc ucc acu ucc uuc cac gca ggc gga ccu gag guu ucu agc cag cuc 240

Ser Ser Thr Ser Phe His Ala Gly Gly Pro Glu Val Ser Ser Gln Leu

65 70 75 80

aac gcg ugu uuu gga uuc cag agg ccg aau uug cgg aag aga cga uuu 288

Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe

85 90 95

ggu ucg ggu ggu guu aau uug gau gaa guu ucg aag aag gag guu gga 336

Gly Ser Gly Gly Val Asn Leu Asp Glu Val Ser Lys Lys Glu Val Gly

100 105 110

gua ggg agu aau gug gaa gug ucu gaa ucg ucu ugc guu gaa uca aau 384

Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn

115 120 125

ucu gga guu gau uuu ggu guu cuc gga cca agc acu agc ucc agg uug 432

Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Leu Gly Pro Ser Thr Ser Ser Arg Leu

130	135	140														
aag	auu	aga	agu	gau	uuu	agg	aga	acu	auu	gac	gaa	aau	gaa	gau	cca	480
Lys	Ile	Arg	Ser	Asp	Phe	Arg	Arg	Thr	Ile	Asp	Glu	Asn	Glu	Asp	Pro	
145	150	155	160													
auc	gau	caa	gcg	gau	aau	gga	guu	gug	aag	uuu	caa	uug	acg	gau	gcu	528
Ile	Asp	Gln	Ala	Asp	Asn	Gly	Val	Val	Lys	Phe	Gln	Leu	Thr	Asp	Ala	
165	170	175														
gau	guc	ucg	ucg	aag	cuu	ugu	gaa	aag	gga	gcu	gug	cca	cuc	acu	ccu	576
Asp	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Cys	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Pro	Leu	Thr	Pro	
180	185	190														
ugu	gga	gag	ucu	ugc	gcu	gag	ucu	auc	uuc	cag	agc	guu	ugu	ucg	uuc	624
Cys	Gly	Glu	Ser	Cys	Ala	Glu	Ser	Ile	Phe	Gln	Ser	Val	Cys	Ser	Phe	
195	200	205														
gaa	gag	aaa	gga	uuu	gac	guu	gaa	gaa	aac	aga	cua	ugg	gaa	uuu	cag	672
Glu	Glu	Lys	Gly	Leu	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Arg	Leu	Trp	Glu	Phe	Gln	
210	215	220														
uuu	cca	gaa	cua	ccg	aga	aau	gag	auc	aau	gaa	acu	uuc	acu	guu	ucg	720
Leu	Pro	Glu	Leu	Pro	Arg	Asn	Glu	Ile	Asn	Glu	Thr	Phe	Thr	Val	Ser	
225		230		235		240										
aag	ucg	gau	ucg	acg	aua	gaa	cag	ugg	ccu	aau	agc	uug	aag	uuu	gaa	768
Lys	Ser	Asp	Ser	Thr	Ile	Glu	Gln	Trp	Pro	Asn	Ser	Leu	Lys	Phe	Glu	
245	250	255														
ucg	gau	cuu	gcu	ugc	acg	gag	caa	uuc	ucu	uau	gag	aau	guu	ucg	gaa	816
Ser	Asp	Leu	Ala	Cys	Thr	Glu	Gln	Phe	Ser	Tyr	Glu	Asn	Val	Ser	Glu	
260	265	270														
uac	ucu	agc	cag	gcg	uug	ucc	gag	cuu	caa	aca	aca	auu	cua	uug	gag	864
Tyr	Ser	Ser	Gln	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Ser	Thr	Ile	Leu	Leu	Glu	
275	280	285														
acg	ucu	gau	acu	gac	ugc	aca	gau	uac	acu	ccu	aca	auu	uuu	uug	gaa	912
Thr	Ser	Asp	Thr	Asp	Cys	Ser	Asp	Tyr	Thr	Pro	Ser	Ile	Phe	Leu	Glu	

290	295	300	
ucc gga agc gaa uuu uca gag aaa ucg aac gac gac gca gcu ccu ucg			960
Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Asp Asp Ala Ala Pro Ser			
305	310	315	320
uca aca uuu agc aug uug cug cag uac aga cgc gac uuu cua aac uua			1008
Ser Thr Phe Ser Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Asn Leu			
325	330	335	
aau gcc ucu cca gac auc aga acu agc ucg ucu auu gaa gaa gag aaa			1056
Asn Ala Ser Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Ser Ile Glu Glu Glu Lys			
340	345	350	
gua gau caa ucu acg aau ugg acg aug aag aag ccu auc uaa			1098
Val Asp Gln Ser Thr Asn Trp Thr Met Lys Lys Pro Ile			
355	360	365	
uguucagaag uagagaaaga cgccaaauuga uuauucgcga cuacguagag gaguaucggu			1158
ccacaacgga uuauggcgau cucauucucc agcaacgguc aaaugugguc caauggauag			1218
uugaacgauc gagagauucc aaacuucauc aggagacgac auuuuuagga guuacccucc			1278
uggaccagau ucugagcaga ggauucuuca aagcuggaag acaccuucaa auucuggca			1338
uagcaugucu aacuuuggcg acuagaauug aagaaaauca gucauacagc ugguucuacc			1398
ugaaagcugc ugaggcugac ucgaauuugg agaaucgagc uaagaacuuu gcggagcugg			1458
uucuuucaga caaaguccaa uuuuguuauu ucciuucaac uauugcagcu gcgguuguca			1518
ucuuggcguc cnuaggagaa aaacaagaug caccaaguca acgagucauu gagguacaua			1578
aauacaaaaua ccuguuagag agaaaacucc uuuaucuuua uauugaccca auugaacaaa			1638
uaaacaaagua uuuugaaauc gagaagaaac uuuua			1673
<210> 4			
<211> 365			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic Construct			
<400> 4			
Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser			
1	5	10	15

Pro Pro Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Arg Ser  
           20                 25                 30  
 Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro  
                      35                 40                 45  
 Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser  
           50                 55                 60  
 Ser Ser Thr Ser Phe His Ala Gly Gly Pro Glu Val Ser Ser Gln Leu  
   65                 70                 75                 80  
 Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe  
           85                 90                 95  
 Gly Ser Gly Gly Val Asn Leu Asp Glu Val Ser Lys Lys Glu Val Gly  
                      100                 105                 110  
 Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn  
           115                 120                 125  
 Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Leu Gly Pro Ser Thr Ser Ser Arg Leu  
           130                 135                 140  
 Lys Ile Arg Ser Asp Phe Arg Arg Thr Ile Asp Glu Asn Glu Asp Pro  
   145                 150                 155                 160  
 Ile Asp Gln Ala Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Gln Leu Thr Asp Ala  
                      165                 170                 175  
 Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Glu Lys Gly Ala Val Pro Leu Thr Pro  
           180                 185                 190  
 Cys Gly Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe  
           195                 200                 205  
 Glu Glu Lys Gly Leu Asp Val Glu Glu Asn Arg Leu Trp Glu Phe Gln  
           210                 215                 220  
 Leu Pro Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ile Asn Glu Thr Phe Thr Val Ser  
                      225                 230                 235                 240  
 Lys Ser Asp Ser Thr Ile Glu Gln Trp Pro Asn Ser Leu Lys Phe Glu  
           245                 250                 255  
 Ser Asp Leu Ala Cys Thr Glu Gln Phe Ser Tyr Glu Asn Val Ser Glu

260	265	270
Tyr Ser Ser Gln Ala Leu Ser Glu Leu Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu		
275	280	285
Thr Ser Asp Thr Asp Cys Ser Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Phe Leu Glu		
290	295	300
Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Asp Asp Ala Ala Pro Ser		
305	310	315
Ser Thr Phe Ser Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Asn Leu		
325	330	335
Asn Ala Ser Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Ser Ile Glu Glu Glu Lys		
340	345	350
Val Asp Gln Ser Thr Asn Trp Thr Met Lys Lys Pro Ile		
355	360	365
<210> 5		
<211> 2348		
<212> DNA		
<213> Cucumis melo		
<220><221> CDS		
<222> (192)..(1925)		
<300><308> GenBank/XM_008454203.1		
<309> 2014-06-25		
<313> (1)..(2348)		
<400> 5		
aactgataaa aacattccaa attgagggat caaatgata tttcacacga aaaggaggag 60		
gagggtggga cccacttcga gagaaacctc aattcgaatt cacattctc cttcgatcc 120		
tttaacttcc taactgctct gtttccatc acgaaactcc atttcatct tcctccttaa 180		
tcgcaaacac c atg aaa tcc aag aaa cga agg cct aat ccc aac cct caa 230		
Met Lys Ser Lys Lys Arg Arg Pro Asn Pro Asn Pro Gln		
1	5	10
tcc ttc tct cca ccc aag aac aag aag ctc cgt tct cac ctt cca cgc 278		
Ser Phe Ser Pro Pro Lys Asn Lys Lys Leu Arg Ser His Leu Pro Arg		
15	20	25

cgc aaa cgc ccg agg att tca cct ttt ctc tgc tct aat ttg gtt tcc	326
Arg Lys Arg Pro Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys Ser Asn Leu Val Ser	
 30                   35                   40                   45	
cat tcc ccc gct ccc tcc acc acc ttt gct ttg gct gcc gca gaa tcc	374
His Ser Pro Ala Pro Ser Thr Thr Phe Ala Leu Ala Ala Glu Ser	
 50                   55                   60	
acc tcc act tcc ttc tac aca tcc cga cct gac gtt tct agc cac ctc	422
Thr Ser Thr Ser Phe Tyr Thr Ser Arg Pro Asp Val Ser Ser His Leu	
 65                   70                   75	
 agc gct ccc aat ttc agg aag aga cga ttt gat tcc aag aag gag gtt	470
Ser Ala Pro Asn Phe Arg Lys Arg Arg Phe Asp Ser Lys Lys Glu Val	
 80                   85                   90	
gga gta ggg agt aat gtg gaa gtg tct gaa tct tct tgt gtt gaa tct	518
Gly Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser	
 95                   100                 105	
aat tct gga gtt gat ttt ggt gtt tcc gga cca agc act act tcg aag	566
 Asn Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Ser Gly Pro Ser Thr Thr Ser Lys	
110                 115                 120                 125	
tta aag aat agg agt agt ttt agg aca act att aac gga aat gaa gat	614
Leu Lys Asn Arg Ser Ser Phe Arg Thr Thr Ile Asn Gly Asn Glu Asp	
 130                 135                 140	
caa att gat cca gcg gag aat gga gtt gag aag ttc gaa ttc acg gat	662
Gln Ile Asp Pro Ala Glu Asn Gly Val Glu Lys Phe Glu Phe Thr Asp	
 145                 150                 155	
gtt gat gtc tcg tcg aag ctt tgt gga aag gaa gct gtg gta ctc act	710
Val Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Gly Lys Glu Ala Val Val Leu Thr	
 160                 165                 170	
tct tgt gta gag tct tgt gct gaa tct atc ttt cag agt gtt tgt ccg	758
Ser Cys Val Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Pro	

175	180	185	
ttc gaa gag aaa cga tta gaa gtt gaa gat aac aga cta tgg gaa ttt			806
Phe Glu Glu Lys Arg Leu Glu Val Glu Asp Asn Arg Leu Trp Glu Phe			
190	195	200	205
cag tta cct gag cta ccg aga aat gag att aat gaa act ttc act gtt			854
Gln Leu Pro Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ile Asn Glu Thr Phe Thr Val			
210	215	220	
tcg aag tcg gat tcg acg ata gaa cag tgg cct ggc agc ttg aag ttt			902
Ser Lys Ser Asp Ser Thr Ile Glu Gln Trp Pro Gly Ser Leu Lys Phe			
225	230	235	
gaa tcg gat ctt gct tgc acg gag caa ttc tct tac gat gat gtt tcg			950
Glu Ser Asp Leu Ala Cys Thr Glu Gln Phe Ser Tyr Asp Asp Val Ser			
240	245	250	
gaa tac tct agc cag gcg ttg tcg ctt cag tca act att cta ttg gag			998
Glu Tyr Ser Ser Gln Ala Leu Ser Leu Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu			
255	260	265	
act tct gat gag tac tgc tca gat tac act cca tca att ttc ttg gaa			1046
Thr Ser Asp Glu Tyr Cys Ser Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Phe Leu Glu			
270	275	280	285
tcc gga agc gaa ttt tca gag aaa tcg aac gaa gac gca gct cct tca			1094
Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Glu Asp Ala Ala Pro Ser			
290	295	300	
tcg aca ttt aga atg ttg ctg cag tac aga cgc gac ttt cta agc tta			1142
Ser Thr Phe Arg Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Ser Leu			
305	310	315	
aat tcc tct cca gac atc aga act agc tcg cct att gaa gaa gaa aaa			1190
Asn Ser Ser Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Pro Ile Glu Glu Glu Lys			
320	325	330	
gta gat caa tct acg att ctg aga ttt gaa gaa ttg gac gac gaa gaa			1238

Val Asp Gln Ser Thr Ile Leu Arg Phe Glu Glu Leu Asp Asp Glu Glu  
 335 340 345  
 gcc tat cga atg ttc aga aat aga gaa aga cgc caa ttg att att cac 1286  
 Ala Tyr Arg Met Phe Arg Asn Arg Glu Arg Arg Gln Leu Ile Ile His  
 350 355 360 365  
 gac tac ata gag gag tat cga tcc aca acg gat tat ggc gat ctc att 1334  
 Asp Tyr Ile Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Leu Ile  
  
 370 375 380  
 ctt cag caa cgg tca aat atg gtc caa tgg ata gtt gaa cga tct aga 1382  
 Leu Gln Gln Arg Ser Asn Met Val Gln Trp Ile Val Glu Arg Ser Arg  
 385 390 395  
 gaa aac aaa ctt cat cag gag acg aca ttt tta gga gtt acc ctt cta 1430  
 Glu Asn Lys Leu His Gln Glu Thr Thr Phe Leu Gly Val Thr Leu Leu  
 400 405 410  
  
 gac cag att ctg agc aaa gga ttc ttc aaa gct gaa agt cgc ctt caa 1478  
 Asp Gln Ile Leu Ser Lys Gly Phe Phe Lys Ala Glu Ser Arg Leu Gln  
 415 420 425  
 att cta ggc ata gca tgt cta act ttg gcg act aga att gaa gaa aat 1526  
 Ile Leu Gly Ile Ala Cys Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ile Glu Glu Asn  
 430 435 440 445  
 cag tca tac agc tgg tta cag caa agg aat atc cat gta ggg agc aac 1574  
  
 Gln Ser Tyr Ser Trp Leu Gln Gln Arg Asn Ile His Val Gly Ser Asn  
 450 455 460  
 acg tac aga aga gca gaa gtt gtt ggc atg gaa tgg ctt gtt gaa gaa 1622  
 Thr Tyr Arg Arg Ala Glu Val Val Gly Met Glu Trp Leu Val Glu Glu  
 465 470 475  
 gtt ctt aag ttc cat tgt ttc ttg cca act gtt tac aac ttc ttg tgg 1670  
 Val Leu Lys Phe His Cys Phe Leu Pro Thr Val Tyr Asn Phe Leu Trp  
  
 480 485 490  
 ttc tac ctg aaa gct gct gga gct aac tca gat ttg gag aat cga gct 1718  
 Phe Tyr Leu Lys Ala Ala Gly Ala Asn Ser Asp Leu Glu Asn Arg Ala

495	500	505	
-----	-----	-----	--

aag aat ttc gca gtg ctc gtt ctt gca gac aaa gtc caa ttt tgt tat	1766
---	------

Lys Asn Phe Ala Val Leu Val Leu Ala Asp Lys Val Gln Phe Cys Tyr	
---	--

510	515	520	525
-----	-----	-----	-----

ttc cct tca aca att gca gct gca gtt gtc atc ttg gcg tcc tta gga	1814
---	------

Phe Pro Ser Thr Ile Ala Ala Ala Val Val Ile Leu Ala Ser Leu Gly	
---	--

530	535	540	
-----	-----	-----	--

gaa aaa caa gat gca cca agt caa cga gtc att gag aca cat gtc aga	1862
---	------

Glu Lys Gln Asp Ala Pro Ser Gln Arg Val Ile Glu Thr His Val Arg	
---	--

545	550	555	
-----	-----	-----	--

aca gaa aac gac gat ctg cct gaa tgt atc gag agc ttg gag tgg cta	1910
---	------

Thr Glu Asn Asp Asp Leu Pro Glu Cys Ile Glu Ser Leu Glu Trp Leu	
---	--

560	565	570	
-----	-----	-----	--

tta aag ctt tta tga tgaaagcatc aaatcctaac acagcaaaaa agaaaggcaag	1965
--	------

Leu Lys Leu Leu	
-----------------	--

575	
-----	--

caattggctc ttttgacata ttcttgacca cttaaacatc atcttgaaca cagctagtga	2025
---	------

agctcaccct ccgaaaaccag ctatatagggt aagacattca tcaattcagt tctttctat	2085
--	------

tctatcacca acagaatgaa aatttggttt ttcctttcaa attttattat aacaagagat	2145
---	------

tgaatcagga cctagtcaag tccaaaacca aatagtattt gatgttcatt tacatgctt	2205
--	------

cataatttca tgatatttagt agtgttgaat tacaggatgt atgttaattga tactcagacc	2265
---	------

taatgactct atattttca cccaaaacaaa caatggttac gatgagattt tcaatactcg	2325
---	------

agcaattgaa gctaaaaatg taa	2348
---------------------------	------

<210> 6	
---------	--

<211> 577	
-----------	--

<212> PRT	
-----------	--

<213> Cucumis melo	
--------------------	--

<400> 6	
---------	--

Met Lys Ser Lys Lys Arg Arg Pro Asn Pro Asn Pro Gln Ser Phe Ser	
---	--

1	5	10	15
---	---	----	----

Pro Pro Lys Asn Lys Lys Leu Arg Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg	
---	--

20	25	30
Pro Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys Ser Asn Leu Val Ser His Ser Pro		
35	40	45
Ala Pro Ser Thr Thr Phe Ala Leu Ala Ala Glu Ser Thr Ser Thr		
50	55	60
Ser Phe Tyr Thr Ser Arg Pro Asp Val Ser Ser His Leu Ser Ala Pro		
65	70	75
Asn Phe Arg Lys Arg Arg Phe Asp Ser Lys Lys Glu Val Gly Val Gly		
85	90	95
Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn Ser Gly		
100	105	110
Val Asp Phe Gly Val Ser Gly Pro Ser Thr Thr Ser Lys Leu Lys Asn		
115	120	125
Arg Ser Ser Phe Arg Thr Thr Ile Asn Gly Asn Glu Asp Gln Ile Asp		
130	135	140
Pro Ala Glu Asn Gly Val Glu Lys Phe Glu Phe Thr Asp Val Asp Val		
145	150	155
Ser Ser Lys Leu Cys Gly Lys Glu Ala Val Val Leu Thr Ser Cys Val		
165	170	175
Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Pro Phe Glu Glu		
180	185	190
Lys Arg Leu Glu Val Glu Asp Asn Arg Leu Trp Glu Phe Gln Leu Pro		
195	200	205
Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ile Asn Glu Thr Phe Thr Val Ser Lys Ser		
210	215	220
Asp Ser Thr Ile Glu Gln Trp Pro Gly Ser Leu Lys Phe Glu Ser Asp		
225	230	235
Leu Ala Cys Thr Glu Gln Phe Ser Tyr Asp Asp Val Ser Glu Tyr Ser		
245	250	255
Ser Gln Ala Leu Ser Leu Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu Thr Ser Asp		
260	265	270

Glu Tyr Cys Ser Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Phe Leu Glu Ser Gly Ser  
 275 280 285  
 Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Glu Asp Ala Ala Pro Ser Ser Thr Phe  
 290 295 300  
 Arg Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Ser Leu Asn Ser Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Pro Ile Glu Glu Lys Val Asp Gln  
 325 330 335  
 Ser Thr Ile Leu Arg Phe Glu Glu Leu Asp Asp Glu Glu Ala Tyr Arg  
 340 345 350  
 Met Phe Arg Asn Arg Glu Arg Arg Gln Leu Ile Ile His Asp Tyr Ile  
 355 360 365  
 Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Leu Ile Leu Gln Gln  
 370 375 380  
 Arg Ser Asn Met Val Gln Trp Ile Val Glu Arg Ser Arg Glu Asn Lys  
 385 390 395 400  
 Leu His Gln Glu Thr Thr Phe Leu Gly Val Thr Leu Leu Asp Gln Ile  
 405 410 415  
 Leu Ser Lys Gly Phe Phe Lys Ala Glu Ser Arg Leu Gln Ile Leu Gly  
 420 425 430  
 Ile Ala Cys Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ile Glu Glu Asn Gln Ser Tyr  
 435 440 445  
 Ser Trp Leu Gln Gln Arg Asn Ile His Val Gly Ser Asn Thr Tyr Arg  
 450 455 460  
 Arg Ala Glu Val Val Gly Met Glu Trp Leu Val Glu Glu Val Leu Lys  
 465 470 475 480  
 Phe His Cys Phe Leu Pro Thr Val Tyr Asn Phe Leu Trp Phe Tyr Leu  
 485 490 495  
 Lys Ala Ala Gly Ala Asn Ser Asp Leu Glu Asn Arg Ala Lys Asn Phe  
 500 505 510  
 Ala Val Leu Val Leu Ala Asp Lys Val Gln Phe Cys Tyr Phe Pro Ser

515	520	525
Thr Ile Ala Ala Ala Val Val Ile Leu Ala Ser Leu Gly Glu Lys Gln		
530	535	540
Asp Ala Pro Ser Gln Arg Val Ile Glu Thr His Val Arg Thr Glu Asn		
545	550	555
Asp Asp Leu Pro Glu Cys Ile Glu Ser Leu Glu Trp Leu Leu Lys Leu		
565	570	575
Leu		

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 7

gtaaaaacgac ggcaggatgc ctctccagac atcagaac 38

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 8

caggaaacag ctatgaccaa tcggttgtgg accgatac 38

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 9

gtaaaaacgac ggcaggatgc cttcgtaa cattagc 38

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt;

&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 10

caggaaacag ctatgacctt ggcgtttc tctacttctg 40

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 11

caggaaacag ctatgaccct ggtccaggag ggtaactc 38

<210> 12

<211> 569

<212> PRT

<213> Cucumis sativus

<400> 12

Met Lys Ser Lys Lys Arg Arg Pro Asn Pro Lys Pro Gln Ser Phe Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

Pro Pro Lys Asn Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Lys Arg

20	25	30
----	----	----

Pro Leu Ile Leu Pro Phe Phe Cys Cys Tyr Leu Asp Ser Asp Ser Pro

35	40	45
----	----	----

Pro Pro Ser Thr Thr Phe Ser Phe Ala Ser Ser Ser Phe Thr Ala

50	55	60
----	----	----

Ala Gln Ser Thr Ser Thr Phe Phe Pro Thr Gly Pro Glu Val Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser His Leu Asn Pro Leu Asn Phe Arg Lys Thr Arg Phe Asp Ser Asn

85	90	95
----	----	----

Lys Glu Val Gly Val Gly Ser Asn Glu Gln Val Ser Glu Ser Ser Cys

100	105	110
-----	-----	-----

Val Glu Ser Asn Ser Gly Leu Asp Phe Gly Val Ser Gly Pro Ser Thr

115	120	125
-----	-----	-----

Thr Ser Lys Leu Lys Asn Arg Arg Thr Ile His Gly Asn Glu Asp Pro

130	135	140
Ile Asp Pro Ala Glu Asn Gly Val Asp Ala Ser Ser Lys Leu Cys Gly		
145	150	155
Lys Gly Ala Val Val Leu Thr Ser Cys Val Glu Ser Cys Ala Glu Ser		
165	170	175
Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe Glu Glu Lys Gly Leu Glu Val Glu		
180	185	190
Asp Asn Arg Leu Trp Glu Phe Gln Leu Pro Glu Leu Gln Lys Asn Glu		
195	200	205
Ile Asn Lys Thr Phe Thr Val Ser Lys Ser Asp Ser Thr Ile Glu Gln		
210	215	220
Trp Pro Gly Ser Leu Lys Ile Glu Ser Asp Leu Ala Cys Thr Glu Gln		
225	230	235
Phe Ser Tyr Asp Asp Val Ser Glu Tyr Leu Ser Gln Pro Leu Ser Leu		
245	250	255
Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu Met Ser Asp Asp Cys Ser Asp Tyr Thr		
260	265	270
Pro Ser Ile Phe Leu Glu Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn		
275	280	285
Glu Asp Ala Ala Pro Thr Ser Thr Phe Thr Met Leu Leu Gln Tyr Arg		
290	295	300
Arg Glu Phe Ile Ser Leu Asn Phe Ser His Ile Arg Thr Ser Ser Ser		
305	310	315
Ile Glu Glu Glu Val Asp Gln Ser Thr Ile Leu Arg Phe Glu Glu		
325	330	335
Leu Asp Asp Glu Glu Ala Tyr Arg Met Phe Arg Asn Arg Glu Arg Arg		
340	345	350
Gln Leu Ile Ile Cys Asp Tyr Ile Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Thr Asp		
355	360	365
Tyr Gly Asp Phe Ile Leu Gln Gln Arg Ser Asn Met Val Gln Trp Ile		
370	375	380

Val Glu Arg Ser Arg Glu Lys Lys Leu His Gln Glu Thr Thr Phe Leu  
 385                    390                    395                    400

Gly Val Thr Leu Leu Asp Gln Ile Leu Ser Lys Gly Phe Phe Lys Ala  
 405                    410                    415

Glu Thr His Leu Gln Ile Leu Gly Ile Ala Cys Leu Thr Leu Ala Thr  
 420                    425                    430

Arg Ile Glu Glu Asn Gln Ser Tyr Ser Trp Leu Gln Gln Arg Asn Ile  
 435                    440                    445

His Val Gly Ser Asn Thr Tyr Arg Arg Ser Lys Val Val Gly Met Glu  
 450                    455                    460

Trp Leu Val Glu Glu Val Leu Lys Phe His Cys Phe Leu Pro Thr Val  
 465                    470                    475                    480

Tyr Asn Phe Leu Trp Phe Tyr Leu Lys Ala Ala Gly Ala Asn Ser Asp  
 485                    490                    495

Leu Glu Asn Arg Ala Lys Asn Phe Ala Val Leu Val Leu Ala Glu Lys  
 500                    505                    510

Val Gln Phe Cys Tyr Phe Pro Ser Thr Ile Ala Ala Ala Val Val Ile  
 515                    520                    525

Leu Ala Ser Leu Gly Glu Lys Gln Asp Ala Pro Ser Glu Arg Val Ile  
 530                    535                    540

Glu Ile His Val Arg Thr Glu Asn Asp Asp Leu Pro Glu Cys Ile Glu  
 545                    550                    555                    560

Ser Leu Glu Trp Leu Leu Lys Phe Leu  
 565

<210> 13

<211> 50

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> sequence of sample 114 and 115 of Figure 2

<400> 13

acgatttgaa gatttgaaga attggacgtt gaagaaggctt atctaatgtt                    50

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> sequence of sample 114 and 115 of Figure 2

<400> 14

Thr Ile Leu Arg Phe Glu Glu Leu Asp Asp Glu Glu Ala Tyr Leu Met

1	5	10	15
---	---	----	----

Phe

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> sequence of sample 116 and 117 of Figure 2

<400> 15

acgaatttggaa ccatgttttttgcctatctaa tgttt	34
--	----

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213

> artificial

<220><223> sequence of sample 116 and 117 of Figure 2

<400> 16

Thr Asn Trp Thr Met Lys Lys Pro Ile

1	5		
---	---	--	--

<210> 17

<211> 1689

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Citrullus lanatus - cDNA of cyclin SDS like gene comprising a C

to T mutation of nucleotide 670 resulting in a STOP codon

<220><221> CDS

<222> (1)..(672)

<400> 17

atg aag tcc aag aag cca agg gca aat ccc aaa ccc gaa tcc tac tct	48
Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser	
1                         5                         10                         15	
ccg ccg aag aag aag ctc cgt tct cag ctt cca cgg cgc aga cgc tct	96
Pro Pro Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Arg Ser	
20                         25                         30	
cgg att tct cct ttt ttc tgc tcc ttg gac tcc gat tcc cct gct cct	144
Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro	
35                         40                         45	
tct acc acc att gct ttt gct tct tcc ttt gct gcc gcc gaa tcc	192
Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser	
50                         55                         60	
agc tcc act tcc ttc cac gca ggc gga cct gag gtt tct agc cag ctc	240
Ser Ser Thr Ser Phe His Ala Gly Gly Pro Glu Val Ser Ser Gln Leu	
65                         70                         75                         80	
aac gcg tgt ttt gga ttc cag agg ccg aat ttg cgg aag aga cga ttt	288
Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe	
85                         90                         95	
ggt tcg ggt ggt gtt aat ttg gat gaa gtt tcg aag aag gag gtt gga	336
Gly Ser Gly Gly Val Asn Leu Asp Glu Val Ser Lys Lys Glu Val Gly	
100                         105                         110	
gta ggg agt aat gtg gaa gtg tct gaa tcg tct tgc gtt gaa tca aat	384
Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn	
115                         120                         125	
tct gga gtt gat ttt ggt gtt ctc gga cca agc act agc tcc agg ttg	432
Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Leu Gly Pro Ser Thr Ser Ser Arg Leu	
130                         135                         140	
aag att aga agt gat ttt agg aga act att gac gaa aat gaa gat cca	480
Lys Ile Arg Ser Asp Phe Arg Arg Thr Ile Asp Glu Asn Glu Asp Pro	

145	150	155	160		
				528	
atc gat caa gcg gat aat gga gtt gtg aag ttt caa ttg acg gat gct Ile Asp Gln Ala Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Gln Leu Thr Asp Ala					
165	170	175			
gat gtc tcg tcg aag ctt tgt gaa aag gga gct gtg cca ctc act cct Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Glu Lys Gly Ala Val Pro Leu Thr Pro				576	
180	185	190			
tgt gga gag tct tgc gct gag tct atc ttc cag agc gtt tgt tcg ttc Cys Gly Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe				624	
195	200	205			
gaa gag aaa gga tta gac gtt gaa gaa aac aga cta tgg gaa ttt tag Glu Glu Lys Gly Leu Asp Val Glu Glu Asn Arg Leu Trp Glu Phe				672	
210	215	220			
ttaccagaac taccgagaaa tgagatcaat gaaacttca ctgtttcgaa gtcggattcg acgatagaac agtggcctaa tagcttgaag tttgaatcgg atcttgctt cacggagcaa				732	
				792	
ttctcttag agaatgttcc ggaatactct agccaggcgt tgtccgagct tcaatcaaca attctattgg agacgtctga tactgactgc tcagattaca ctccttcaat tttttggaa					852
tccggaagcg aattttcaga gaaatcgaac gacgacgcag ctccttcgtc aacatttgc atgttgctgc agtacagacg cgactttcta aacttaatg cctctccaga catcagaact					912
agctcgtctta ttgaagaaga gaaagttagat caatctacga ttttgagatt tgaagaattg gacgatgaag aagcctatct aatgttctaga agtagagaaa gacgccaatt gattattcgc					972
gactacgttag aggagtatcg gtccacaacg gattatggcg atctcattct ccagcaacgg tcaaatgtgg tccaatggat agttgaacga tcgagagatt ccaaacttca tcaggagacg					1032
					1092
acattttag gagttaccct cctggaccag attctgagca gaggattctt caaagctgga agacacccctt aaattctggg catagcatgt ctaactttgg cgactagaat tgaagaaaat					1152
cagtcataca gctggttcta cctgaaagct gctggagctg actcgaattt ggagaatcga gctaagaact ttgcggagct ggttcttca gacaaagtcc aattttgtta tttcccttca					1452
actatttgcag ctgcgggttgt catcttggcg tcccttaggaa aaaaacaaga tgcaccaagt caacgagtca ttgaggtaca taaatacataa tacctgttag agagaaaaact cctttatctt					1512
					1572
					1632

tatattgacc caattgaaca aataaacaag tatttgaaa tcgagaagaa actttaa 1689  
 <210> 18  
 <211> 223  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> Synthetic Construct  
 <400> 18  
 Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Pro Lys Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Arg Ser  
 20 25 30  
 Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro  
 35 40 45  
 Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser  
 50 55 60  
 Ser Ser Thr Ser Phe His Ala Gly Gly Pro Glu Val Ser Ser Gln Leu  
 65 70 75 80  
 Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe  
 85 90 95  
 Gly Ser Gly Gly Val Asn Leu Asp Glu Val Ser Lys Lys Glu Val Gly  
 100 105 110  
 Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn  
 115 120 125  
 Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Leu Gly Pro Ser Thr Ser Ser Arg Leu  
 130 135 140  
 Lys Ile Arg Ser Asp Phe Arg Arg Thr Ile Asp Glu Asn Glu Asp Pro  
 145 150 155 160  
 Ile Asp Gln Ala Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Gln Leu Thr Asp Ala  
 165 170 175  
 Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Glu Lys Gly Ala Val Pro Leu Thr Pro  
 180 185 190  
 Cys Gly Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe

195                    200                    205

Glu Glu Lys Gly Leu Asp Val Glu Glu Asn Arg Leu Trp Glu Phe

210                    215                    220

<210> 19

<211> 590

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Solanum lycopersicum

<400> 19

Met Lys Arg Lys Leu His Ala Glu Ala Val Gln Pro Ala Val Gln Gln

1                    5                    10                    15

Pro Lys Glu Ile Leu Pro Ala Val Lys Arg Gln Leu Arg Ser Lys Leu

20                    25                    30

Pro Arg Arg Lys Arg Ser His Ile Ser Pro Ile Leu Arg Ser Phe Ser

35                    40                    45

Ile Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Ser Glu Val Ser Arg Gln Ser Ser

50                    55                    60

Lys Gly Ser Val Asn Lys Glu Val Lys Lys Arg Glu Ile Glu Gly Glu

65                    70                    75                    80

Glu Phe Arg Arg Ile Thr Arg Ala Tyr Phe Arg Lys Lys Leu Leu Val

85                    90                    95

Asp Gln Lys Lys Asp Ser Glu Val Glu Leu Ser Glu Cys Ser Cys Val

100                    105                    110

Asp Ser Cys Ser Glu Val Ile Gly Lys Ile Ile Lys Ile Glu Asp Pro

115                    120                    125

Val Asp Ile Ser Arg Asp Ile Val Ser Lys Arg Asn Arg Asn Ala Lys

130                    135                    140

Val Ile Glu Gly Thr Glu Asp Ser Glu Val Ile Ser Arg Phe Leu Lys

145                    150                    155                    160

Ala Ser Gly Gly Phe Cys Gly Glu Ser Ser Lys Ser Gly Glu Asp Ala

165                    170                    175

Val Ala Arg Ser Arg Asn Ala Ala Lys Ile Ile His Glu Asp Val Val

180	185	190
Ser Phe Asn Ser Val Leu Gln Ser Pro Ser Glu Ser Lys Cys Gly Asn		
195	200	205
Leu Ser Val Gln Ser Ile Lys Cys Ser Glu Asn Arg Ala Ala Glu Glu		
210	215	220
Val Glu Ser Glu Val Ser Arg Val Cys Pro Glu Val Glu Leu Ser Ala		
225	230	235
240		
Val Glu Gln Ala His Glu Lys Leu Val Glu Ala Glu Leu Asp Leu Glu		
245	250	255
Cys Ser Glu Asn Phe Ser Ile Val Asp Val Ser Asp Asp Tyr Ser Ser		
260	265	270
Ala Tyr Ser Glu Leu Gln Ser Glu Ile Phe Pro Glu Ser Ser Asp Ile		
275	280	285
Asp Ile Ser Asp Tyr Ser Pro Ser Tyr Trp Tyr Asp Ser Gly Ser Gln		
290	295	300
Phe Ser Glu Lys Ser Asn Ala Asp Ala Ser Pro Ser Pro Thr Phe Thr		
305	310	315
320		
Leu Phe Leu Arg Phe Gly Gln Gln Phe Cys Arg Ser Thr Ala Ala Leu		
325	330	335
Gln Ser Thr Pro Ile Asn Ser Ser Glu Asp Gln Ile Ser Thr Glu Phe		
340	345	350
Thr Gly Leu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Ser Tyr Arg Met Ile Arg		
355	360	365
Asn Arg Glu Arg Arg Gln Leu Tyr Leu His Asp Tyr Ala Glu Glu Tyr		
370	375	380
Cys Ser Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Leu Ile Val Gln Gln Arg Leu Gln		
385	390	395
400		
Met Val His Trp Ile Leu Glu Gln Ala Thr Arg Lys Asp Leu Gln Lys		
405	410	415
Glu Thr Met Phe Leu Ser Val Asn Leu Phe Asp Arg Phe Leu Ser Lys		
420	425	430

Gly Tyr Phe Lys Thr Lys Arg Cys Leu Gln Ile Ala Gly Ile Ala Cys

435 440 445

Leu Thr Leu Ala Val Arg Ile Glu Glu Asn Gln Pro Phe Asn Ser Ile

450 455 460

Arg Gln Lys Thr Phe Ser Val Ala Gly Thr Thr Tyr Ser Cys Ser Glu

465 470 475 480

Val Val Ala Met Glu Trp Leu Val Gln Glu Val Leu Asn Phe Gln Cys

485 490 495

Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Asn Phe Leu Trp Phe Tyr Leu Lys Ala Ala

500 505 510

Thr Ala Thr Glu Tyr Met Glu Lys Thr Ala Lys Tyr Leu Ala Val Leu

515 520 525

Ala Leu Leu Gly His Glu His Leu Cys Tyr Arg Pro Ser Thr Val Ala

530 535 540

Ser Ala Leu Val Ile Leu Ala Leu Ser Ala Ala Asn Leu Tyr Ala Ser

545 550 555 560

Cys His Leu Val Thr Lys Thr His Ala Lys Ile Glu Asp Glu Asp Leu

565 570 575

Pro Glu Cys Ile Lys Ser Leu Glu Trp Leu Val Lys Tyr Ile

580 585 590

<210> 20

<211> 560

<212> PRT

<213> Capsicum annuum

<400> 20

Met Lys Arg Asn Leu His Ala Glu Ala Ala Glu Ile Leu Pro Ala Met

1 5 10 15

Lys Lys Gln Leu Arg Ser Lys Leu Pro Arg Arg Lys Arg Ser His Ile

20 25 30

Ser Pro Ile Leu Leu Ser Val Asn Lys Glu Thr Val Val Val Lys

35 40 45

Lys Lys Arg Glu Ile Glu Val Asp Glu Phe Arg Arg Ile Thr Arg Ala  
 50 55 60  
 Tyr Leu Lys Lys Asp Ala Glu Val Glu Leu Ser Glu Cys Ser Cys  
 65 70 75 80  
 Val Asp Ser Cys Ser Glu Ile Val Gly Lys Ile Val Lys Ile Glu Asp  
 85 90 95  
 Pro Val Asp Ile Ser His Asp Ile Val Ser Lys Gln Lys Arg Asn Ala  
 100 105 110  
 Lys Val Val Glu Gly Thr Glu Asp Ser Asp Ala Ile Ser Phe Leu Lys  
 115 120 125  
 Asn Ala Ser Gly Phe Phe Gly Glu Ser Ser Lys Ser Gly Val Asp Val  
 130 135 140  
 Ser Val Glu Gly Ser Arg Thr Thr Glu Lys Ile Asn Asp Glu Asp Val  
 145 150 155 160  
 Val Ser Phe Asn Ser Val Leu Gln Ser Pro Ser Glu Ser Lys Cys Gly  
 165 170 175  
 Asn Leu Ser Val Gln Thr Ile Lys Cys Thr Glu Asn Arg Ala Ala Glu  
 180 185 190  
 Glu Asp Ile Glu Ser Glu Val Ser Arg Ile Tyr Pro Glu Val Glu Leu  
 195 200 205  
 Ser Ala Leu Glu Asn Ala Asn Glu Lys Leu Val Glu Pro Glu Phe Asp  
 210 215 220  
 Leu Glu Cys Ser Glu Asn Phe Ser Val Leu Asp Val Thr Ala Asp Tyr  
 225 230 235 240  
 Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Leu Gln Ser Glu Ile Phe Pro Glu Ser Ser  
 245 250 255  
 Asp Phe Asp Leu Ser Asp Tyr Ser Pro Ser Tyr Trp Tyr Asp Ser Gly  
 260 265 270  
 Ser Gln Phe Ser Glu Lys Ser Asn Gly Asp Ala Thr Pro Ser Pro Thr  
 275 280 285  
 Leu Thr Leu Phe Leu Arg Phe Ser Gln Gln Phe Cys Arg Ser Thr Ala

290	295	300
Ala Leu Gln Phe Thr Ser Val Asn Ser Ser Glu Asp His Ile Ser Thr		
305	310	315
Glu Ile Thr Gly Leu Lys Asp Glu Glu Asp Glu Glu Ser Tyr Met Leu		
325	330	335
Ile Arg Asn Arg Glu Arg Arg Gln Leu Tyr Leu His Asp Tyr Ala Glu		
340	345	350
Glu Tyr Cys Ser Thr Thr Asp Ser Gly Asp Leu Ile Val Gln Gln Arg		
355	360	365
Leu Leu Met Val His Trp Ile Leu Glu Gln Ala Thr Arg Lys Asp Leu		
370	375	380
Leu Lys Glu Thr Met Phe Leu Ser Val Asn Leu Phe Asp Arg Phe Leu		
385	390	395
Ser Lys Gly Tyr Phe Lys Thr Lys Arg Cys Leu Gln Ile Val Gly Ile		
405	410	415
Ala Cys Leu Thr Leu Ala Val Arg Ile Glu Glu Asn Gln Pro Phe Asn		
420	425	430
Ser Ile Arg Gln Lys Thr Phe Thr Val Ala Gly Thr Ala Tyr Ser Cys		
435	440	445
Ser Glu Val Val Ala Met Glu Trp Leu Val Gln Glu Val Leu Asn Phe		
450	455	460
Gln Cys Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Asn Phe Leu Trp Phe Tyr Leu Lys		
465	470	475
Ala Ala Arg Ala Thr Glu Tyr Met Glu Arg Thr Thr Lys Tyr Leu Ala		
485	490	495
Val Leu Ala Leu Leu Gly His Glu His Leu Cys Tyr Arg Pro Ser Thr		
500	505	510
Val Ala Ser Ala Leu Val Ile Leu Ala Leu Ser Ala Ala Asn Leu Tyr		
515	520	525
Val Ser Cys His Leu Val Thr Lys Thr His Ala Lys Ile Lys Asp Glu		
530	535	540

Asp Leu Pro Glu Cys Ile Lys Ser Leu Glu Trp Leu Val Lys Tyr Ile

545                    550                    555                    560

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Forward primer

<400> 21

cgaagagaaa ggatttagacg ttg                    23

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> reverse primer

<400> 22

tctgaggcagt cagtatcaga cg                    22