



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2018.11.30

(21) Номер заявки  
201070652

(22) Дата подачи заявки  
2008.11.25

(51) Int. Cl. C12N 15/82 (2006.01)  
A01H 5/00 (2006.01)

(54) РАСТЕНИЕ РОДА BRASSICA, СОДЕРЖАЩЕЕ МУТАНТНЫЙ АЛЛЕЛЬ INDEHISCENT

(31) 07023052.9; 61/004,660

(32) 2007.11.28; 2007.11.29

(33) EP; US

(43) 2011.02.28

(86) PCT/EP2008/010147

(87) WO 2009/068313 2009.06.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
БАЙЕР КРОПСАЙЕНС Н.В. (BE)

(72) Изобретатель:  
Лага Бенжамен, Ден Бур Барт,  
Ламберт Барт (BE)

(74) Представитель:  
Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,  
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов  
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.  
(RU)

(56) LILJEGREN S.J. et al., Control of fruit  
patterning in Arabidopsis by Indehiscent, Cell, 2004,  
Vol. 116, 843-853

LYSAK M.A. et al., "Chromosome triplication  
found across the tribe Brassiceae", Genome Research,  
2005, 15:516-525, реферат, введение, дискуссия  
US-A-7135621

US-A1-20070006336

WO-A-2004113542

WO-A-2006009649

LYSAK MARTIN A. ET AL.: "Chromosome  
triplication found across the tribe Brassiceae"  
GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR  
LABORATORY PRESS, WOODBURY, NY, US, vol.  
15, no. 4, 1 April 2005 (2005-04-01), pages 516-525,  
XP002517759 ISSN: 1088-9051 the whole document

BARKER GUY C. ET AL.: "Novel insights  
into seed fatty acid synthesis and modification  
pathways from genetic diversity and quantitative trait  
loci analysis of the Brassica C genome" PLANT  
PHYSIOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF PLANT  
PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 144,  
no. 4, 1 August 2007 (2007-08-01), pages 1827-1842,  
XP002517760 ISSN: 0032-0889

(57) Данное изобретение относится к сельскохозяйственным растениям, у которых модулируют характеристики раскрытия плода. Конкретнее, изобретение относится к улучшенным способам и средствам для снижения осыпания семян или задержки осыпания семян до сбора урожая у растений, в то же время сохраняя агрономически подходящую обмолачиваемость стручков.

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области сельскохозяйственных продуктов, конкретно, сельскохозяйственных культур, в частности семейства Brassicaceae, конкретно, рода Brassica, у которого модулируют характеристики раскрытия плода. Конкретнее, изобретение относится к улучшенным способам и средствам снижения осыпания семян или задержки осыпания семян до сбора урожая у растений, таких как растения семейства Brassicaceae, в частности растения семейства Brassicaceae, выращиваемые для продукции семян, в то же время сохраняя агрономически подходящую обмолачиваемость стручков. Изобретение относится как к молекулам нуклеиновой кислоты дикого типа и мутантным, кодирующим белки INDEHISCENT (IND) растений Brassica, так и к белкам как таковым. Также изобретение относится к растениям рода Brassica, содержащим по меньшей мере два гена IND, в частности растениям Brassica napus, и их клеткам, частям, семенам и потомству, отличающимся тем, что они содержат в своем геноме три мутантных аллеля ind с полным нокаутом, благодаря чему существенно изменяются характеристики раскрытия плода. Кроме того, в данном документе предлагаются способы получения растений рода Brassica, у которых уменьшено осыпание семян или у которых осыпание семян задерживается до сбора урожая, при этом предпочтительно сохраняется агрономически подходящая обмолачиваемость стручков, как и семенные стручки и семена, получаемые из таких растений. Дополнительно изобретение относится к средствам детекции (наборам) и способам определения наличия одного или нескольких мутантных аллелей ind и/или аллелей IND дикого типа в биологических образцах, а также способам переноса одного или нескольких мутантных аллелей ind и/или аллелей IND дикого типа в другие растения и способам комбинирования различных аллелей ind и/или IND в растениях. В частности, способы комбинирования подходящего количества мутантных аллелей ind, которые кодируют нефункциональные белки или не кодируют белки IND и/или кодируют белки IND, обладающие значительно сниженной активностью in vivo, таким образом, существенно снижая осыпание семян или задерживая осыпание семян до сбора урожая, в то же время сохраняя агрономически подходящую обмолачиваемость стручков. Кроме того, изобретение относится к применению растений или их частей и/или их потомства, семян и масел из семян и способам и/или наборам по изобретению. Изобретение также относится к способам и средствам повышения урожая, конкретно, урожая зерна и семян. Фенотип, повышающий урожай, может быть отделен от фенотипа со сниженным или задержанным осыпанием семян.

### Уровень техники

Стручки растений Brassica высвобождают свои семена посредством процесса, названного раскрытием плода. Стручок состоит из двух плодолистиков, соединенных край к краю. Соединение между краями образует толстый рубчик, называемый перегородкой. При созревании стручка две створки постепенно отделяются от перегородки по направлению обозначенных линий хрупкости в стручке, в конечном счете приводя к осыпанию семян, которые прикреплялись к перегородке. Зона раскрытия определяет точное местоположение разъединения створок.

Осыпание семян (также обозначаемое как "раскрытие стручка") зрелыми стручками перед или во время сбора урожая зерновых представляет собой повсеместное явление с зерновыми, у которых созревают сухие растрескивающиеся плоды. Осыпание незрелых семян приводит к снижению получению семян, что представляет проблему у сельскохозяйственных культур, которые выращивают главным образом ради семян, таких как растения Brassica - продуценты масла, конкретно масличный рапс. Другая проблема, связанная с осыпанием незрелых семян, заключается в повышении естественного возобновления в последующий зерновой год. У масличного рапса потери урожая, связанные с раскрытием стручка, составляют в среднем 20% (Child et al., 1998, J Exp Bot 49: 829-838), но могут достигать до 50% в зависимости от погодных условий (MacLeod, 1981, Harvesting in Oilseed Rape, pp. 107-120 Cambridge Agricultural Publishing, Cambridge).

В настоящее время коммерческие сорта масличного рапса крайне чувствительны к осыпанию. В существующих программах бридинга *B. napus* существует небольшая разновидность устойчивости к осыпанию, а у диплоидных родителей *B. napus* (*B. oleracea* и *B. gara*), а также у других членов рода Brassica, особенно *B. juncea*, *B. carinata* и *B. nigra*, были обнаружены устойчивые линии. Авторы Kadkol et al. (1986, Aust. J. Botany 34 (5): 595-601) сообщают о повышенной устойчивости к осыпанию у некоторых образцов *B. campestris*, которую ассоциировали с отсутствием разделительного слоя в области прикрепления створок стручка к перегородке. Авторы Prakash и Chopra (1998, Plant breeding 101: 167-168) описывают введение генов устойчивости к осыпанию в Brassica napus от Brassica juncea через негомологичную рекомбинацию. Авторы Spence et al. (1996, J of Microscopy 181: 195-203) описывают, что у некоторых линий Brassica juncea наблюдается пониженная склонность к осыпанию по сравнению с линиями Brassica napus. Авторы Morgan et al., 1998 (Fields Crop Research 58, 153-165) описывают генетическую разновидность устойчивости к раскалыванию стручка среди линий масличного рапса, полученных из синтетического *B. napus* и делают вывод, что у линий, которым требуется больше энергии для раскрытия их стручков, наблюдается повышенная васкуляризация в зоне раскрытия и пониженная деградация клеточной стенки в зоне раскрытия. Они дополнительно обнаружили значительную обратную корреляцию между длиной носика стручка и усилием, необходимым, чтобы вызвать раскрытие стручка. Авторы Child и Nuttly (1999, Proc 10<sup>th</sup> Int. Rapeseed Congress) описывают разновидность зрелости стручка у индуцированно-

го облучением мутантного *B. napus* и популяции его родительского сорта Jet Neuf, при которой у самых устойчивых растений дикого типа и мутантов наблюдалась значительная лигнификация групп клеток по всей зоне раскрытия и при которой описывались сосудистые пучки, расположенные близко к внутреннему краю зоны раскрытия у мутанта, чтобы помочь фиксировать створки. Авторы Child et al. (2003, J. Exp Botany 54 (389): 1919-1930) дополнительно описывают ассоциацию между повышенной устойчивостью к раскрытию стручка и изменениями в структуре сосудов стручков у вновь синтезированной линии *Brassica napus*. Тем не менее, принятые способы бридинга оказались неуспешны во введении устойчивости к раскрытию в сорта рапса, не влияя на другие желаемые качества, такие как раннее цветение, полное созревание и устойчивость к черной ножке (Prakash и Chopra, 1990, Genetical Research 56: 1-2).

У растения *Arabidopsis thaliana* путем анализа мутантов были идентифицированы некоторые гены, которые усиливают или ингибируют раскрытие стручка: сочетанные мутанты как по гену SHATTER-PROOF1 (SHP1; изначально обозначавшемуся AGL1), так и по гену SHATTERPROOF2 (SHP2; изначально обозначавшемуся AGL5) приводят к нераскрывающимся стручкам (т.е. стручкам, которые остаются закрытыми после созревания у *Arabidopsis thaliana*) (Liljegren et al., 2000, Nature 404, 766-770). Аналогично, мутанты по гену INDEHISCENT (обозначаемому как IND1) у *Arabidopsis thaliana* (Liljegren et al., 2004, Cell 116: 843-853; публикация PCT WO 01/79517), а также по гену ALCATRAZ (обозначаемому ALC; Rajani et al. 2001, Current Biology 11, 1914-1922) влияли на раскрытие стручка, приводя к устойчивости к раскрытию стручка. Конститутивная экспрессия гена FRUITFUL (FUL), репрессора SHP и IND, в *Arabidopsis thaliana* также приводила к нераскрывающимся стручкам (Ferrandiz et al., 2000, Science, 289, 436-438). Полагают, что эти факторы транскрипции образуют нелинейную транскрипционную сеть, которая контролирует идентичность края створки и раскрытие стручка. Авторы Liljegren et al. (2004, Cell 116: 843-853) дополнительно описывают, что у *Arabidopsis thaliana* IND атипичный ген, содержащий основной домен спираль-петля-спираль (bHLH), направляет дифференциацию края створки на отделение и лигнифицированные слои. Слой лигнифицированных клеток, примыкающий к слою отделения наряду со слоем эндокарпия b (единственный лигнифицированный клеточный слой в каждой створке) продуцируют пружинообразное натяжение в сухом плоде, которое обеспечивает его открытие. Для лигнификации слоя эндокарпия b створки необходимы активности генов IND, SHP, ALC и FUL, фактора транскрипции MADS-домена, который экспрессируется на протяжении створок (Liljegren et al., 2004, выше; Mandel и Yanofsky, 1995, Plant Cell 7, 1763-1771). Было обнаружено, что ген FUL и ген REPLUMLESS (RPL), гомеодомен-содержащий фактор транскрипции, который экспрессируется в перегородке (Roeder et al., 2003, Curr Biol 13, 1630-1635), определяют границы генов, которые придают идентичность краю створки (Gu et al., 1998, Development 125, 1509-1517; Ferrandiz et al., 2000, Science, 289, 436-438; Roeder et al., 2003, выше). В заключение, FILAMENTOUS FLOWER (FIL) и YABBY3 (YAB3), два фактора транскрипции семейства YABBY (Sawa et al., 1999, Genes Dev 13, 1079-1088; Siegfried et al., 1999, Development 126, 4117-4128), и JAGGED (JAG), фактор транскрипции белкового домена "цинковые пальцы" C2H2 (Dinneny et al., 2004, Development 131, 1101-1110; Ohno et al., 2004, Development 131, 1111-1122), идентифицировали как обеспечивающие с резервом развитие собственно створки и края створки за счет стимуляции экспрессии генов FUL и SHP участок-специфическим образом (Dinneny et al., 2005, Development 132, 4 687-4 696). Также были идентифицированы гены для большого числа гидролитических ферментов, таких как эндополигалактуроназы, которые имеют значение в процессе раскрытия стручка в запрограммированного разрыва зоны раскрытия в стручках растений *Brassica* (см., например, WO 97/13865; Petersen et al., Plant. Mol. Biol., 1996, 31:517-527).

Авторы Liljegren et al. (2004, Cell 116: 843-853) описывают пять мутантных аллелей IND у растения *Arabidopsis*. В растениях, содержащих эти мутантные аллели, лигнифицированные клетки в зоне раскрытия либо отсутствуют, либо присутствуют в зависимости от сложности мутаций (сложные мутанты ind не содержат лигнифицированных клеток в участке, соответствующем внутренней части края створки у растений дикого типа), но во всех случаях стручок не раскрывается. Авторы Wu et al. (2006, Planta 224, 971-979) описывают шестой мутантный аллель гена IND *Arabidopsis*. У растений, содержащих этот мутантный аллель, не наблюдается лигнифицированных клеток в соединениях края створки и перегородки, они содержат несколько клеток в участке из семи слоев клеток, которые, по-видимому, окружают общеизвестную зону раскрытия и границу перегородки у растений дикого типа, и в этом слое наблюдается незавершенное клеточное деление.

В патентах US 2005/0120417 и US 2007/0006336 описываются идентификация и выделение двух ортологов гена IND1 из растения *Brassica napus*.

В WO 99/00503, WO 01/79517 и WO 01/59122 описывается снижение экспрессии генов ALC, IND, AGL1 и AGL5 растения *Arabidopsis* и их ортологов, используя методики сайленсинга гена (такие как антисмысловая супрессия или косупрессия) и мутагенез.

Авторы Vancanneyt et al., 2002 (XIII Международная конференция по исследованию *Arabidopsis*, Севилья, Испания 28 июня - 2 июля; 2002) сообщили, что экспрессия гена FUL из *A. thaliana* под контролем промотора CaMV 35S в масличном рапсе привела к большому числу трансформантов, устойчивых к раскрытию стручка. Стручки таких устойчивых к раскрытию стручка линий не имели зоны раскрытия, и раскрытие стручков могло быть достигнуто лишь с помощью случайной трещины створок, прикладывая

значительное давление.

Авторы Vancanneyt et al., 2002 (XIII Международная конференция по исследованию Arabidopsis, Севилья, Испания 28 июня - 2 июля; 2002) также сообщили, что сайленсинг гена IND в Arabidopsis thaliana, используя так называемые методики сайленсинга двуцепочечной РНК, привел к почти полной устойчивости к раскрытию стручка. У девяносто восьми процентов трансгенных линий Arabidopsis созрели стручки, которые не открылись вдоль шва створок, и могли быть открыты лишь прикладывая существенное давление на створки.

Важно понимать, что несмотря на то, что осыпание семян составляет важную проблему в культуре масличного рапса, которая может быть решена разработкой линий, устойчивых к раскрытию стручка, прежде всего, еще необходимо отделение семян от стручков. В обычной сельскохозяйственной практике это достигается путем обмолота стручков с помощью зерноуборочного комбайна. Обмолот стручков зерноуборочным комбайном должен быть полным и должен вызвать минимальное повреждение семян, высвобождаемых таким образом. Тем не менее, при повышении прочности стручков более сложное действие, требуемое для их обмолота, приводит к неприемлемой степени повреждения семян. Стручки растений Brassicaceae, устойчивых к раскрытию стручка, не должны поэтому быть такими прочными, чтобы их невозможно было обмолотить в зерноуборочном комбайне (Bruce et al. 2001, J. Agric. Engng Res. 80, 343-350).

В WO 2004/113542 описывается, что умеренный генный дцРНК-сайленсинг генов, вовлеченных в развитие зоны раскрытия и краев створок стручков в растениях Brassicaceae, позволяет выделить трансгенные линии с повышенной устойчивостью к раскрытию стручка и пониженным осыпанием семян, стручки которых тем не менее могут все-таки открываться вдоль зоны раскрытия за счет приложения ограниченных физических усилий.

Несмотря на то обстоятельство, что последовательности специфических генов IND и их мутантные последовательности, в частности, последовательности гена IND Arabidopsis и Brassica napus и мутантные последовательности гена IND Arabidopsis, доступны в данной области, сохраняется необходимость в дополнительных последовательностях гена IND, например, для получения особенно желаемой модификации осыпания семян у растений, таких как растения Brassica napus. Выделение мутантных аллелей, соответствующих аллелю ind, в экономически важных растениях семейства Brassicaceae, таких как масличный рапс, представляет собой трудоемкую и требующую временных затрат задачу. Более того, такое выделение может быть осложнено амфидиплоидией у масличного рапса и вытекающим отсюда функциональным избытком соответствующих генов.

Эти и другие цели решаются настоящим изобретением, как показано с помощью большого числа вариантов осуществления, описанных в сущности изобретения, фигурах, подробном описании, примерах и формуле изобретения.

### Сущность изобретения

Авторы изобретения обнаружили, что характеристики раскрытия плода у растений Brassica могут контролироваться посредством контроля за количеством генов/аллелей IND, которые "функционально экспрессируются" в семенных стручках, т.е. которые приводят к функциональному (биологически активному) белку IND. Комбинируя количество мутантных аллелей IND с полным нокаутом ("аллели ind"), в то же время сохранив минимальное число аллелей IND дикого типа, приводящее к минимальному уровню функционального белка IND, характеристики раскрытия семенных стручков могут быть модифицированы, конкретнее, устойчивость к раскрытию стручка может быть повышена и осыпание семян может быть уменьшено или осыпание семян может быть задержано до сбора урожая, в то же время сохраняя агрономически подходящую обмолачиваемость стручков, так что стручки могут все-таки открываться вдоль зоны раскрытия за счет приложения ограниченных физических усилий. Полагают, что минимальное число аллелей IND дикого типа необходимо, чтобы все-таки дать возможность отделения семян от стручков, в частности, путем обмолота стручков комбайном, таким образом, чтобы обмолот стручков оказался полным и привел к минимальному повреждению семян, высвобождаемых таким образом.

Таким образом, по первому аспекту настоящее изобретение относится к растению Brassica, содержащему, по меньшей мере, два гена IND, в частности, растению Brassica napus (и его частям, таким как семенные стручки и семена), отличающемуся тем, что оно содержит в своем геноме три мутантных аллеля IND с полным нокаутом, в частности, ген IND-A1 и/или IND-C1, и где устойчивость к раскрытию стручка растения существенно повышается по сравнению с устойчивостью к раскрытию стручка растения, не содержащего мутантных аллелей IND, но где растение предпочтительно сохраняет агрономически подходящую обмолачиваемость стручков.

В другом аспекте изобретение относится к (выделенным) последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки IND дикого типа и/или мутантные, а также их фрагментам, и способам применения этих последовательностей нуклеиновых кислот для модификации характеристик раскрытия плода растений. Изобретение также относится к самим белкам и их применению.

Изобретение дополнительно относится к растению и его клеткам, частям, семенам и потомству, содержащим, по меньшей мере, один мутантный аллель IND с полным нокаутом, и таким образом, сниженное количество функционального белка IND, по сравнению с растением и его клетками, частями,

семенами и потомством, содержащими аллель IND, кодирующий соответствующий функциональный белок IND. Такие растения и их клетки, части, семена и потомство могут быть использованы для получения растений с модифицированными характеристиками раскрытия плода, в частности, для получения растений Brassica со значительно сниженным осыпанием семян, у которых сохраняется агрономически подходящая обмолачиваемость стручков. Под используемым в данном документе термином "часть растения" понимают любую часть, полученную из растения по изобретению, включая части растения, такие как клетки, ткани, органы, семена, семенные стручки, семенную муку, рапсовый жмых, растительные жиры или масла.

В дополнительном аспекте изобретение относится к семенным стручкам с модифицированной устойчивостью к раскалыванию, которые могут быть получены из растения по настоящему изобретению, и применению указанных семенных стручков, например, для посева и выращивания потомства растений.

В еще одном аспекте изобретения предлагаются способы получения и селекции растений и их клеток, частей, семян и потомства, содержащих, по меньшей мере, один аллель ind с полным нокаутом. В частности, предлагаются способы получения и селекции растений Brassica, содержащих по меньшей мере два гена IND, в частности, растений Brassica napus и их клеток, частей, семян и потомства, содержащих по меньшей мере один мутантный аллель ind с полным нокаутом, присутствующий по меньшей мере в одном по меньшей мере из двух различных локусов IND в геноме, например по меньшей мере в одном из двух различных локусов гена IND-A1 и IND-C1 Brassica, и различия между наличием мутантных аллелей ind и аллелей IND дикого типа в растении или части растения. Таким образом, предлагаются способы (такие как мутагенез и/или селекция с помощью маркера) получения и/или идентификации аллелей ind или растений или частей растений, содержащих такие аллели, и комбинирования подходящего количества аллелей ind и/или различных типов аллелей ind в одном растении, благодаря чему значительно модифицируются характеристики раскрытия плода этого растения.

В другом варианте осуществления изобретения мутантные аллели IND по изобретению используют для повышения урожая собранных семян или зерна из растений Brassica. Увеличенный урожай может быть следствием снижения или задержки осыпания семян, но также может не зависеть от сниженного или задержанного осыпания семян. В частности, предлагаются растения Brassica, содержащие, по меньшей мере, два гена IND, или их клетка, часть, семена или потомство, отличающиеся тем, что эти растения содержат в своем геноме два мутантных гомозиготных аллеля IND, как описано в данном документе.

#### Описание фигур

Фиг. 1 - схематическое представление гена IND-A1, кодирующего белок IND-A1 дикого типа растения Brassica napus (SEQ ID NO: 5).

Фиг. 2 - схематическое представление гена IND-C1, кодирующего белок IND-C1 дикого типа растения Brassica napus (SEQ ID NO: 7).

На фиг. 1 и 2 положения мутаций, описанных в примерах (обозначаемых "EMSxx" согласно соответствующему им наименованию "ind-xx-EMSxx", как описано в примерах), указывается вертикальными линиями; длина и положение специфических зондов для гена IND (обозначаемых "ID xx" согласно соответствующему им номеру последовательности SEQ ID NO: xx) указываются горизонтальными линиями ниже схематического представления генов IND; положение специфических праймеров для гена IND (обозначаемых "ID xx" согласно соответствующему им номеру последовательности SEQ ID NO: xx) указывается стрелками.

#### Основные определения

Под используемыми в данном документе терминами "повышение устойчивости к раскалыванию стручка" и "снижение осыпания семян" понимают уменьшенную склонность к осыпанию семян и/или задержку сроков осыпания семян, в частности до сбора урожая, растений Brassica, плоды которых обычно созревают не одновременно, а последовательно, так что некоторые стручки трескаются и осыпают свои семена до или во время сбора урожая. Уровень устойчивости к раскалыванию стручка прямо коррелирует и может, например, быть измерен путем определения усилия, требуемого для раскола стручков в "тесте распределения по прочности на раскол" (Davies and Bruce, 1997, J Mat Sci 32: 5895-5899; Morgan et al., 1998, Fields Crop Research 58, 153-165), количества интактных стручков, остающихся после, например, 20 сек (<sup>1</sup>IP20; Morgan et al., 1998, выше), 9,7 или 17 сек (Bruce et al., 2002, Biosystems Eng 81(2): 179-184) в "тесте случайного удара", периода полужизни образцов стручков ("LD50") в тесте случайного удара, т.е. времени обработки, необходимого, чтобы вызвать открытие 50% стручков в тестируемых образцах стручков, и "шкалы раскалывания в полевых условиях" (Morgan et al., 1998, выше). Тесты случайного удара (RIT) и алгоритмы определения периода полужизни образцов стручков в таких тестах RIT описаны в статьях Bruce et al., 2002 (выше), Morgan et al., 1998 (выше) и примерах ниже. Обе публикации приводятся поэтому в данном документе в качестве ссылки. Вкратце, образец интактных созревших стручков помещают в закрытую емкость вместе со стальными шариками и емкость затем энергично перемешивают в течение увеличивающихся периодов времени (например, 10, 20, 40, 80 с). После каждого периода емкость открывают и подсчитывают количество разбитых и поврежденных стручков. Самую точную оценку уровня устойчивости к расколу для каждой линии рассчитывают, вычерчивая график в прямоугольных координатах для всех доступных данных и оценивая время, необходимое, чтобы разбить

половину стручков в образце ("период полужизни образца стручков" или "LD50"). Важно, тем не менее, чтобы стручки открывались главным образом вдоль зоны раскола, а не были просто размолены, что может наблюдаться с нерасколотыми стручками.

Под используемым в данном документе термином "агрономически подходящее повышение устойчивости к расколу стручков" понимают повышение устойчивости к расколу стручков в растении, которое приводит к потерям урожая, связанным с расколом стручков в полевых условиях (до сбора урожая), менее, чем обычно наблюдаемые потери для данного растения в полевых условиях. В отношении масличного рапса сообщается, что потери урожая, связанные с расколом стручков в полевых условиях, составляют около 11% за сезон со средними хорошими условиями роста и около 25% за сезон со средними плохими условиями роста. Была обнаружена положительная корреляция между этими уровнями потери семян и уровнем потери семян при времени обработки 9,7 и 17 с, соответственно, в тесте случайного удара, описанном Bruce et al., 2002 (Biosystems Eng 81(2): 179-184). Альтернативно, для определения, является ли уровень устойчивости к расколу стручков в растении агрономически подходящим, период полужизни образца стручков ("LD50", см. выше) данного растения может быть сравнен с периодом полужизни образца стручков растения, как известно, обладающего средним уровнем устойчивости к расколу стручков, такого как для масличного рапса все в настоящее время коммерчески доступные сорта масличного рапса.

Под используемым в данном документе термином "раскол стручка или осыпание семян" или "раскалывание плода или стручка" понимают процесс, который происходит в плоде после созревания семян, вследствие которого створки отходят от центральной перепонки, высвобождая семена. Область, которая трескается (т.е. "зона раскола"), простирается на всю длину плода между створками и перегородкой (внешней перепонкой). При созревании "зона раскола" представляет собой, по существу, нелигнифицированный слой клеток между областью лигнифицированных клеток в створке и перегородкой. Раскол происходит из-за совмещения ослабления клеточной стенки в зоне раскола и натяжения, определяемого различными механическими свойствами сухих клеток в стручке.

Под используемым в данном документе термином "плод" растения Brassica понимают орган растения Brassica, который развивается из гинецея, состоящего из слитых плодолистиков, который при опылении вырастает, становясь "(семенным) стручком" или "стручком", который содержит созревающие семена. "(Семенной) стручок" или "стручок" растения Brassica состоит из плодовой оболочки (плодолистика), заключающего две полости внутри завязи, отделенные перепонкой. "Зоны раскола" развиваются по краям плодолистика, соединенным с перепонкой, и простираются по длине стручка. Клетки зоны раскола в конечном счете начинают разрушаться, и это ослабляет контакт между стенками плодолистика или створками и перепонкой. Ослабление клеточного взаимодействия ограничивается клетками зоны раскола и является следствием разрыва средней ламеллы (Meakin and Roberts, 1990, J Exp Bot 41, 995-1011).

Под используемым в данном документе термином "зоны раскола" понимают слои однородных паренхиматозных клеток, содержащиеся в местах соединения, расположенных с обеих сторон двухстворчатого стручка растений, в частности растений Brassica. Зоны раскола расположены между краем створки стручка и центральной перегородкой, которая содержит главный сосудистый пучок к цветоножке или плодоножке. Расхождение клеток в зоне раскола происходит в процессе старения стручка и завершается временем, когда стручки полностью созревают (Meakin and Roberts, 1990, выше). Затем может происходить отделение створок. Зона раскола содержит остатки сосудов, которые проходят от стенки стручка к плодоножке (цветоножке) и перегородке. Процесс раскола стручка происходит лишь после того, как внешняя сила ломает тонкие сосудистые нити, давая возможность створкам отделиться и семенам осыпаться на землю. Это происходит при воздействии навеса, например, при контакте с комбайном во время сбора урожая. Сосудистая ткань содержит утолщенные лигнифицированные клетки, которые образуют колленхиматозные группы клеток, обнаруженные прикрепленными к проводящим клеткам (Meakin and Roberts, 1990, выше). Это обеспечивает ригидность ткани и, по-видимому, некоторую устойчивость к разрушению.

Под используемым в данном документе термином "агрономически подходящая обмолачиваемость" понимают устойчивость стручка, в частности, стручка масличного рапса, к открытию вдоль зоны раскрытия стручка с одновременным высвобождением семян до приложения физических усилий, которые дают возможность полного раскрытия стручков, в то же время предотвращая повреждение семян, которые применяются, например, в зерноуборочном комбайне. Была обнаружена положительная корреляция между периодом полужизни образца стручков ("LD50") в тесте случайного удара и их обмолачиваемостью. Периоды полужизни образцов стручков масличного рапса, определенные в тесте RIT, осуществленном как описано в примерах, которые соответствуют агрономически подходящей обмолачиваемости, не должны превышать 80 с. Типичные величины полужизни образцов для контрольных линий коммерчески доступных сортов масличного рапса составляют около 10 с. Таким образом, линии со значительно повышенной устойчивостью к раскалыванию стручка при агрономически подходящей обмолачиваемости имеют период полужизни образца стручков в тесте RIT между около 10 и около 80 с, между около 10 и около 60 с, между около 10 и около 50 с, между около 20 и около 60 с, между около 20 и около 50 с,

между около 40 и около 60 с, около 57 с.

Под термином "сельскохозяйственное растение" понимают вид растения, культивируемого в качестве зерновой культуры, такой как *Brassica napus* (AACC, 2n=38), *Brassica juncea* (AABB, 2n=36), *Brassica carinata* (BBCC, 2n=34), *Brassica rapa* (синоним *B. campestris*) (AA, 2n=20), *Brassica oleracea* (CC, 2n=18) или *Brassica nigra* (BB, 2n=16). Определение не включает сорняков, таких как *Arabidopsis thaliana*.

Под термином "последовательность нуклеиновой кислоты" (или молекула нуклеиновой кислоты) понимают молекулу ДНК или РНК в одно- или двуцепочечной форме, в частности ДНК, кодирующую белок или фрагмент белка по изобретению. Под термином "последовательность эндогенной нуклеиновой кислоты" понимают последовательность нуклеиновой кислоты в растительной клетке, например, эндогенный аллель гена *IND*, присутствующий в ядерном геноме клетки *Brassica*. Термин "последовательность выделенной нуклеиновой кислоты" используют для обращения к последовательности нуклеиновой кислоты, которая не длиннее в своем природном окружении, например, *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине.

Под термином "ген" понимают последовательность ДНК, содержащую участок (транскрибируемый участок), которая транскрибируется в молекулу РНК (например, в пре-мРНК, содержащую интронные последовательности, которая затем сплайсируется в зрелую мРНК, или непосредственно в мРНК без интронных последовательностей) в клетке, функционально связанную с регуляторными участками (например, промотором). Ген может таким образом содержать несколько функционально связанных последовательностей, таких как промотор, 5'-лидерная последовательность, содержащая, например, последовательности, вовлеченные в инициацию трансляции, кодирующий (белок) участок (кДНК или геномная ДНК) и 3'-нетранслируемая последовательность, содержащая, например, сайты терминации транскрипции. "Эндогенный ген" используют для различения с "чужеродным геном", "трансгеном" или "химерным геном", и под этим термином понимают ген из растения некоторого рода, вида или сорта растений, который не был встроен в это растение путем трансформации (т.е. он не является "трансгеном"), но который обычно присутствует в растениях данного рода, вида или сорта, или который встраивают в это растение из растений другого рода, вида или сорта растений, в которых он обычно присутствует, путем стандартных методик бридинга или путем соматической гибридизации, например, посредством слияния протопластов. Аналогично, "эндогенный аллель" гена не встраивают в растение или ткань растения путем трансформации растения, а например, создают с помощью мутагенеза и/или селекции растений или получают посредством скрининга природных популяций растений.

Под термином "экспрессия гена" или "генная экспрессия" понимают процесс, при котором участок ДНК, который функционально связан с подходящими регуляторными участками, в частности промотором, транскрибируется в молекулу РНК. Молекула РНК затем дополнительно процессируется (посредством посттранскрипционных процессов) в клетке, например, путем сплайсинга РНК и инициации трансляции и трансляции в аминокислотную цепь (полипептид), и терминации трансляции с помощью стоп-кодонов трансляции. Термин "функционально экспрессированный" используют в данном документе для указания, что получен функциональный белок; термин "не функционально экспрессированный" - для указания, что получен белок с существенно сниженной функциональностью или с отсутствием функциональности (биологической активности) или что белок не продуцируется (см. дополнительно ниже).

Термины "белок" или "полипептид" используются взаимозаменяемо и относятся к молекулам, состоящим из цепи аминокислот, без упоминания конкретного способа действия, размера, 3-мерной структуры или источника. "Фрагмент" или "часть" белка *IND* может, таким образом, еще обозначаться как "белок". "Выделенный белок" используют для обозначения белка, который не длиннее в своих естественных условиях, например, *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине. Термин "фактор транскрипции" используют для обозначения белка, состоящего, по меньшей мере, из двух отдельных доменов - ДНК-связывающего домена и домена активации или репрессии - которые функционируют совместно, модулируя степень инициации транскрипции на основе промоторов мишеных генов (Ptashne, 1988, Nature 335, 683-689). Термин "фактор транскрипции, содержащий основной домен спираль-петля-спираль (bHLH)" используют для обозначения фактора транскрипции, содержащего, за исключением ДНК-связывающего домена bHLH (Heim et al., 2003, Mol Biol Evol 20, 735-747; Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15, 1749-1770), домены, которые, как известно, важны для регуляции генной экспрессии, которые могут быть консервативными на аминокислотном уровне в родственных белках из различных видов (Quong et al., 1993, Mol Cell Biol 13, 792-800). Регуляторы транскрипции, содержащие домен bHLH, связывают ДНК через остатки в основном участке, тогда как домен спираль-петля-спираль стимулирует димеризацию, давая возможность членам семейства образовывать гетеро- или гомодимеры (Murre et al., 1989, Cell 56, 777-783).

Под термином "ген *IND*" в данном документе понимают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок *INDEHISCENT* (*IND*), который представляет собой фактор транскрипции, содержащий домен bHLH, необходимый для разбрасывания семян (Liljegren et al., 2004, Cell 116: 843-853).

Под используемым в данном документе термином "аллель(и)" понимают какую-либо одну или несколько альтернативных форм гена в конкретном локусе. В диплоидной (или амфидиплоидной) клетке организма аллели данного гена расположены в конкретном участке или локусе (локусах) на хромосоме.

Один аллель присутствует на каждой хромосоме пары гомологичных хромосом.

Под используемым в данном документе термином "гомологичные хромосомы" понимают хромосомы, которые содержат информацию об одних и тех же биологических признаках и содержат аналогичные гены в аналогичных локусах, но возможно различные аллели этих генов. Гомологичные хромосомы представляют собой хромосомы, которые составляют пару во время мейоза. "Негомологичные хромосомы", представляющие все биологические признаки организма, образуют набор, и количество наборов в клетке называется пloidностью. Диплоидные организмы содержат два набора негомологичных хромосом, в которых каждая гомологичная хромосома наследуется от отличного родителя. У амфидиплоидных видов присутствуют по существу два набора диплоидных геномов, благодаря чему хромосомы двух геномов обозначаются как "гомеологичные хромосомы" (и аналогично локусы или гены двух геномов обозначаются как гомеологичные локусы или гены). Диплоидный или амфидиплоидный вид растения может содержать большое число различных аллелей в конкретном локусе.

Под используемым в данном документе термином "гетерозиготный" понимают генетическое состояние, существующее, если в специфическом локусе расположены два различных аллеля, но находятся по отдельности на соответствующих парах гомологичных хромосом в клетке. Напротив, под используемым в данном документе термином "гомозиготный" понимают генетическое состояние, существующее, если в специфическом локусе расположены два идентичных аллеля, но находятся по отдельности на соответствующих парах гомологичных хромосом в клетке.

Под используемым в данном документе термином "локус" (во множественном числе локусы) понимают специфический участок или участки или сайт на хромосоме, где находится, например, ген или генетический маркер. Например, под "локусом IND-A1" понимают положение на хромосоме генома A, где может быть обнаружен ген IND-A1 (и два аллеля IND-A1), тогда как под "локусом IND-C1" понимают положение на хромосоме генома C, где может быть обнаружен ген IND-C1 (и два аллеля IND-C1).

При ссылке на "растение" или "растения" по изобретению понимают, если иного не оговорено, что данное изобретение охватывает также части растения (клетки, ткани или органы, семенные стручки, семена, сложные составляющие, такие как корни, листья, цветки, пыльцу и т.д.), потомство растений, которое сохраняет отличительные характеристики родителей (особенно характеристики раскрытия плода), такое как семена, полученные самоопылением или перекрестным опылением, например, гибридные семена (полученные перекрестным опылением двух инбредных родительских линий), гибридные растения и части растений, полученные из них.

Под "молекулярным исследованием" (или тестом) в данном документе понимают исследование, которое указывает (непосредственно или косвенно) на наличие или отсутствие одного или нескольких конкретных аллелей IND в одном или обоих локусах IND (например, в одном или обоих локусах IND-A1 или IND-C1). В одном из вариантов осуществления это позволяет определить, является ли определенный аллель (дикого типа или мутантный) гомозиготным или гетерозиготным по данному локусу в любом конкретном растении.

Под используемым в данном документе термином "дикий тип" понимают типичную форму растения или гена, встречаемую в природе наиболее часто. Под "растением дикого типа" понимают растение с самым распространенным фенотипом из такого растения в природной популяции. Под "аллелем дикого типа" понимают аллель гена, необходимый для получения фенотипа дикого типа. Напротив, под "мутантным растением" понимают растение с редким фенотипом, отличающимся от такого растения в природной популяции или получаемое путем вмешательства человека, например, с помощью мутагенеза, и под "мутантным аллелем" понимают аллель гена, необходимый для получения мутантного фенотипа.

Под используемым в данном документе термином "IND дикого типа" (например, IND-A1 или IND-C1 дикого типа) понимают природный аллель IND, обнаруженный в растениях, в частности растениях семейства Brassicaceae, особенно растениях рода Brassica, который кодирует функциональный белок IND (например, функциональный IND-A1 или IND-C1, соответственно). Напротив, под используемым в данном документе термином "мутантный IND" (например, мутантный IND-A1 или IND-C1) понимают аллель IND, который не кодирует функциональный белок IND, т.е. аллель IND, кодирующий нефункциональный белок IND (например, нефункциональный IND-A1 или IND-C1, соответственно), который, как используется в данном документе, относится к белку IND, не обладающему биологической активностью или обладающему значительно сниженной биологической активностью по сравнению с соответствующим функциональным белком IND дикого типа, или не кодирующий белок IND вообще. Такой "мутантный аллель IND" (также называемый "полным нокаутом" или "нулевым" аллелем) представляет собой аллель IND дикого типа, который содержит одну или несколько мутаций в своей последовательности нуклеиновой кислоты, благодаря чему мутация(и) предпочтительно приводит(ят) к существенно уменьшенному (абсолютному или относительному) количеству функционального белка IND в клетке *in vivo*. Под используемым в данном документе термином "аллель IND с полным нокаутом" понимают мутантный аллель IND, нахождение которого в гомозиготном состоянии в каждом локусе IND в растении (например, растении Brassica napus с двумя аллелями IND-A1 с полным нокаутом и двумя аллелями IND-C1 с полным нокаутом) приводит к повышению устойчивости к раскрытию стручка в таком растении, которая слишком высока, чтобы быть еще агрономически подходящей. Мутантные аллели последовательно-



стей нуклеиновых кислот, кодирующих белок IND, обозначаются в данном документе как "ind" (например, ind-a1 или ind-c1, соответственно). Мутантные аллели могут представлять собой либо "природные мутантные" аллели, которые являются мутантными аллелями, обнаруженными в природе (например, получаемыми спонтанно без применения человеком мутагенеза), либо "индуцированные мутантные" аллели, которые индуцируются вмешательством человека, например, мутагенезом.

Под "существенно уменьшенным количеством функционального белка IND" (например, функционального белка IND-A1 или IND-C1) понимают снижение количества функционального белка IND, продуцируемого клеткой, содержащей мутантный аллель IND, по меньшей мере, на 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 100% (т.е. функциональный белок IND не продуцируется клеткой) по сравнению с количеством функционального белка IND, продуцируемого клеткой, не содержащей мутантного аллеля IND. Это определение охватывает продукцию "нефункционального" белка IND (например, усеченного белка IND), не обладающего биологической активностью *in vivo*, уменьшение абсолютного количества функционального белка IND (например, функциональный белок IND не создается вследствие мутации в гене IND), и/или продукцию белка IND со значительно сниженной биологической активностью по сравнению с активностью функционального белка IND дикого типа (такого как белок IND, в котором один или несколько аминокислотных остатков, которые важны для биологической активности кодируемого белка IND, как приведено в примере ниже, замещены другим аминокислотным остатком). Под используемым в данном документе термином "мутантный белок IND" понимают белок IND, кодируемый мутантной последовательностью нуклеиновой кислоты IND ("аллель ind"), вследствие чего мутация приводит к значительно сниженной активности и/или отсутствию активности IND *in vivo*, по сравнению с активностью белка IND, кодируемого немутантной последовательностью IND дикого типа ("аллель IND").

Под используемым в данном документе термином "мутагенез" понимают процесс, при котором растительные клетки (например, большое число семян или других частей растения рода Brassica, таких как пыльца и т.д.) подвергают методике, которая индуцирует мутации в ДНК клеток, такой как контакт с мутагенным агентом, таким как химическое вещество (такое как этилметилсульфонат (EMS), этилнитрозомочевина (ENU), и.д.) или ионизирующая радиация (нейтронами (такая как мутагенез быстрыми нейтронами и т.д.), альфа-излучение, гамма-излучение (такое как излучение, создаваемое источником излучения кобальтом-60), рентгеновское излучение, ультрафиолетовое излучение и т.д.) или комбинации двух или больше из них. Таким образом, желаемый мутагенез одного или нескольких аллелей IND может быть осуществлен, используя химические средства, такие как контакт одной или нескольких тканей растения с этилметилсульфонатом (EMS), этилнитрозомочевинной и т.д., используя физические средства, такие как рентгеновское излучение и т.д. или с помощью гамма-излучения, такого как излучение, создаваемое источником излучения кобальтом-60. В то время как мутации, создаваемые облучением, обычно представляют собой протяженные делеции или другие большие повреждения, такие как транслокации или комплексные перестройки, мутации, создаваемые химическими мутагенами, обычно представляют собой более дискретные повреждения, такие как точковые мутации. Например, EMS алкилирует гуаниновые основания, что приводит к ошибочному спариванию: алкилированный гуанин будет создавать пару с тиминовым основанием, приводя главным образом к транзициям G/C в A/T. После мутагенеза растения Brassica регенерируют из обработанных клеток, используя известные техники. Например, полученные семена Brassica могут быть посеяны в соответствии с принятыми способами выращивания, и после самоопыления на растениях образуются семена. Альтернативно, для непосредственного образования гомозиготных растений могут быть получены двойные гаплоидные проростки, например, как описано авторами Coventry et al. (1988, Manual for Microspore Culture Technique for Brassica napus. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489. Univ. of Guelph, Guelph, Ontario, Canada). Дополнительные семена, которые образуются в результате такого самоопыления в существующем или последующем поколении, могут быть собраны и скринированы на наличие мутантных аллелей IND. Известно несколько методик скринирования специфических мутантных аллелей, например, в Deleteagene™ (Делеция одного гена; Li et al., 2001, Plant J 27: 235-242) используются исследования с полимеразной цепной реакцией (ПЦР) для скрининга мутантов с делецией, полученных с помощью мутагенеза быстрыми нейтронами, в методике TILLING (мишенные индуцированные локальные повреждения в геномах; McCallum et al., 2000, Nat Biotechnol 18:455-457) идентифицируют точковые мутации, индуцированные EMS, и т.д. Дополнительные методики скрининга на наличие специфических мутантных аллелей IND описываются в примерах ниже.

Под используемым в данном документе термином "не встречающееся в природе" при использовании в отношении растения понимают растение с геномом, который был модифицирован человеком. Трансгенное растение, например, не встречается в природе, оно содержит молекулу экзогенной нуклеиновой кислоты, например, химерный ген, содержащий транскрибируемый участок, который при транскрипции дает биологически активную молекулу РНК, способную снижать экспрессию эндогенного гена, такого как ген IND по изобретению, и таким образом было генетически модифицировано человеком. Кроме того, растение, которое содержит мутацию в эндогенном гене, например, мутацию в эндогенном гене IND (например, в регуляторном элементе или в кодирующей последовательности) в результате экспозиции с мутагенным агентом, также полагают неприродным растением, поскольку оно было генетически модифицировано человеком. Более того, растение определенного вида, такого как Brassica napus,

которое содержит мутацию в эндогенном гене, например, в эндогенном гене IND, которая в природе не встречается в этом конкретном виде растения, в результате, например, способов направленного бридинга, таких как скрещивание с использованием маркера и селекция или интрогрессия, с растением того же или другого вида, такого как *Brassica juncea* или гара, такое растение также полагают растением, не встречающимся в природе. Наоборот, растение, содержащее лишь самопроизвольные или встречающиеся в природе мутации, т.е. растение, которое не было генетически модифицировано человеком, не является "не встречающимся в природе растением", как определяется в данном документе, и поэтому не охватывается данным изобретением. Специалист в данной области понимает, что хотя не встречающееся в природе растение обычно имеет нуклеотидную последовательность, которая изменена по сравнению с встречающимся в природе растением, не встречающееся в природе растение также может быть генетически модифицировано человеком без изменения его нуклеотидной последовательности, например, за счет модифицирования его паттерна метилирования.

Под термином "ортолог" гена или белка в данном документе понимают гомологичный ген или белок, обнаруженный в другом виде, который обладает той же функцией что и данный ген или белок, но (обычно) отличается по последовательности, начиная с точки времени, когда вид, содержащий гены, дивергировал (т.е. гены произошли от общего предка путем видообразования). Ортологи генов IND вида *Brassica napus* могут, таким образом, быть идентифицированы в другом виде растений (например, *Brassica juncea*, и т.д.), основываясь как на сравнениях последовательностей (например, на основе процентов идентичности последовательностей относительно полной последовательности или относительно специфических доменов), так и/или на функциональном анализе.

"Сорт" используется в данном документе в соответствии с конвенцией UPOV и относится к группе растений в пределах одного ботанического таксона низшего известного ранга, эта группировка может определяться экспрессией признаков, получаемых исходя из данного генотипа или комбинации генотипов, может отличаться от любой другой группы растений экспрессией, по меньшей мере, одного из указанных признаков и рассматривается как единица по отношению к ее пригодности для размножения без изменений (стабильная).

Под термином "содержащий" понимают определение наличия установленных частей, стадий или компонентов, но не исключается наличие одного или нескольких дополнительных частей, стадий или компонентов. Растение, содержащее определенный признак, может, таким образом, содержать дополнительные признаки.

Понятно, что при обращении к слову в единственном числе (например, растение или корень) сюда также включается и множественное число (например, множество растений, множество корней). Единственное число, таким образом, обычно подразумевает "по меньшей мере один".

Для цели данного изобретения под "идентичностью последовательностей" двух родственных нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, выраженной в процентах, понимают количество положений в двух оптимально выровненных последовательностях, которые имеют идентичные остатки (хЮО), деленное на количество сравниваемых положений. Под гэпом, т.е. положением в первичной структуре, где остаток присутствует в одной последовательности, но не присутствует в другой, понимают положение с неидентичными остатками. "Оптимальное выравнивание" двух последовательностей находят с помощью выравнивания двух последовательностей по всей длине в соответствии с алгоритмом глобального выравнивания Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J Mol Biol 48 (3) :443-53) в европейском комплекте программного обеспечения по молекулярной биологии (EMBOSS, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16(6): 276--277; см., например, [http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/1Ж\)ex.html](http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/1Ж)ex.html)), используя стандартные настройки (штраф за открытие гэпа = 10 (для нуклеотидов)/10 (для белков) и штраф за продолжение гэпа = 0,5 (для нуклеотидов)/0,5 (для белков)). Для нуклеотидов используемая матрица весов замены представляет собой EDNAFULL и для белков матрица весов замены представляет собой EBLOSUM62.

Под используемым в данном документе термином "по существу идентичный" или "по существу аналогичный" понимают последовательности, которые при оптимальном выравнивании, определенном выше, имеют, по меньшей мере, некоторый минимальный процент идентичности последовательностей (как определяется дополнительно ниже).

"Жесткие условия гибридизации" могут использоваться для идентификации нуклеотидных последовательностей, которые по существу идентичны данной нуклеотидной последовательности. Жесткие условия зависят от последовательности и будут отличаться в различных ситуациях. В целом, выбирают жесткие условия на около 5°C ниже температурной точки плавления ( $T_m$ ) для конкретных последовательностей при определенной ионной силе и величине pH.  $T_m$  представляет собой температуру (при определенной ионной силе и величине pH), при которой 50% мишенной последовательности гидризуется с полностью совместимым зондом. Обычно должны быть выбраны жесткие условия, в которых концентрация соли составляет около 0,02 моль/л при величине pH 7, и температура составляет, по меньшей мере, 60°C. Снижение концентрации соли и/или повышение температуры увеличивает жесткость. Жесткие условия для гибридизаций РНК-ДНК (нозерн-блоты, используя зонд размером, например, 100 нуклеотидов) представляют собой, например, такие условия, которые включают по меньшей мере одну отмывку в

0,2-кратном SSC при 63°C в течение 20 мин или равнозначные условия.

"Очень жесткие условия" могут быть обеспечены, например, гибридизацией при 65°C в водном растворе, содержащем 6-кратный SSC (20-кратный SSC содержит 3,0M NaCl, 0,3M цитрат Na, pH 7,0), 5-кратный раствор Денхардта (100-кратный раствор Денхардта содержит 2% раствор фикола, 2% раствор поливинилпирролидона, 2% раствор бычьего сывороточного альбумина), 0,5% раствор додецилсульфата натрия (SDS) и денатурированную ДНК-носитель в концентрации 20 мкг/мл (одноцепочечная ДНК спермы рыбы со средней длиной 120-3000 нуклеотидов) в качестве неспецифического конкурента. После гибридизации может быть осуществлена отмывка высокой жесткости в несколько стадий с заключительной отмывкой (около 30 мин) при температуре гибридизации в 0,2-0,1-кратном SSC, 0,1% растворе SDS.

Под "условиями умеренной жесткости" понимают условия, равнозначные гибридизации в описанном выше растворе, но при температуре около 60-62°C. Отмывку умеренной жесткости можно осуществить при температуре гибридизации в 1-кратном растворе SSC, 0,1% растворе SDS.

Под "низкой жесткостью" понимают условия, равнозначные гибридизации в описанном выше растворе при температуре около 50-52°C. Отмывку умеренной жесткости можно осуществить при температуре гибридизации в 2-кратном растворе SSC, 0,1% растворе SDS. См. также руководство Sambrook et al. (1989) и Sambrook and Russell (2001).

Под "увеличенным сбором урожая" или "увеличенным сбором семян или зерна" понимают большее количество семян или зерна, собранное от большинства растений, причем каждое из них содержит мутантные аллели IND по изобретению, по сравнению с количеством семян или зерна, собранным от аналогичного количества изогенных растений без мутантных аллелей IND. Урожай обычно выражают в объемных единицах собранных семян на единицы поверхности, таких как бушель/акр или кг/га. Увеличение урожая обычно выражают в процентах, таким образом, урожай референсного или контрольного растения принимают за 100% и урожай растений по изобретению выражают в % относительно урожая контрольного растения. Наблюдаемый урожай повышен у растений Brassica по изобретению, находясь в диапазоне от, по меньшей мере, 101% до, по меньшей мере, 124% и предполагается, что возможно еще большее увеличение урожая. Увеличение урожая может также находиться в диапазоне от 104 до 108% или от 105 до 110%.

#### Подробное описание

Растение Brassica napus (геном AACC,  $2n=4x=38$ ), которое представляет собой аллотетраплоидный (амфидиплоидный) вид, содержащий по существу два диплоидных генома (геном А и геном С) благодаря его происхождению от диплоидных предков, содержит два гена IND в своем геноме. Авторы изобретения обнаружили, что один ген IND локализован в геноме А (в данном документе обозначаемый "IND-A1") и один в геноме С (в данном документе обозначаемый "IND-C1"). Полагают, что ген IND-A1 "гомеологичен" гену IND-C1, т.е. "ген А" обнаружен в геноме А и происходит от диплоидного предка B. gara (AA), тогда как "ген С" обнаружен в геноме С вида B. napus и происходит от диплоидного предка B. oleracea (CC).

Как и в любом диплоидном геноме, для каждого гена IND в каждом локусе IND в геноме могут присутствовать *in vivo* два "аллеля" (один аллель представляет генную последовательность, обнаруженную на одной хромосоме, а другой - на гомологичной хромосоме). Нуклеотидная последовательность этих двух аллелей может быть идентичной (гомозиготное растение) или различной (гетерозиготное растение) в любом данном растении, несмотря на то, что количество различных возможных аллелей, существующих для каждого гена IND, в видовой популяции как в целом может быть намного больше двух.

Более того, было обнаружено, что у растений Brassica napus, которые гомозиготны по аллелю ind с полным нокаутом лишь в одном из двух генов IND, т.е. в IND-A1 или IND-C1, не наблюдается существенного повышения устойчивости к раскалыванию стручка по сравнению с растениями Brassica napus, не содержащими мутантных аллелей IND, тогда как у растений Brassica napus, которые гомозиготны по аллелю ind с полным нокаутом в обоих генах IND, устойчивость к раскалыванию стручка значительно возрастает, но уровень устойчивости к раскалыванию стручка слишком высок для сохранения агрономически подходящей обмолачиваемости. Наоборот, устойчивость к раскалыванию стручка значительно возрастает у растений Brassica napus, содержащих три аллеля ind с полным нокаутом двух генов IND Brassica napus, до нужного уровня, благодаря чему растения сохраняют агрономически подходящую обмолачиваемость стручков. Полагают, что наличие трех аллелей ind с полным нокаутом у растения Brassica, содержащего, по меньшей мере, два гена IND, в частности, у растения Brassica napus, содержащего ген IND-A1 и ген IND-C1, может потребоваться для получения растения, у которого наблюдалась бы повышенная устойчивость к раскалыванию стручка, в то же время сохраняя агрономически подходящую обмолачиваемость стручков.

Таким образом, по одному из вариантов осуществления изобретения в данном документе предлагается растение Brassica, содержащее, по меньшей мере, два гена IND, в частности, растение Brassica napus, содержащее ген IND-A1 и ген IND-C1, содержащие 3 аллеля ind, вследствие чего аллели IND приводят к существенно снижению количеству функционального белка IND типа, кодируемого эквивалентом дикого типа этих мутантных аллелей, и, таким образом, к полному существенно снижению количеству функциональных белков IND, продуцируемых в клетках растения, конкретно, в созревающих семенных

стручках *in vivo*.

Дополнительно полагают, что комбинируя достаточное количество копий специфических (мутантных) аллелей *ind* с достаточным количеством копий специфических (дикого типа) аллелей *IND* в одном растении, в частности растении рода *Brassica*, возможно точно подобрать количество и/или тип созданных функциональных белков *IND*, которые в свою очередь влияют на характеристики раскрытия плода растения. Абсолютное или относительное количество белков *IND* может таким образом быть подобрано таким образом, чтобы получить растения, которые продуцируют достаточное количество белка(ов) *IND* для обеспечения агрономически подходящей обмолачиваемости семенных стручков, в то же время снижая осыпание семян до или во время сбора урожая.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения предлагается растение, в частности растение *Brassica*, содержащее, по меньшей мере, один функционально экспрессируемый аллель *IND*, который кодирует полностью функциональный белок *IND*, в то время как остальные аллели могут быть (мутантными) аллелями *ind*.

В одном из аспектов изобретения предлагается растение *Brassica*, содержащее, по меньшей мере, два гена *IND*, в частности растение *Brassica napus*, содержащее *n*-кратное количество аллелей *IND*, по меньшей мере, 2 различных генов *IND* в этом растении *Brassica*, в частности генов *IND-A1* и *IND-C*, таким образом,  $p < 3$  (например,  $p = 1, 2$  или  $3$ ), так что, по меньшей мере, один аллель продуцирует функциональный белок *IND*.

В дополнительном аспекте изобретения предлагается гомозиготное по *IND* растение с единичной мутацией ( $n = 2$ , т.е. гомозиготное по мутантному аллелю одного гена *IND*) и/или гомозиготное по *IND* растение с двумя мутациями ( $n = 4$ , т.е. гомозиготное по мутантному аллелю двух генов *IND*) вида *Brassica*, содержащее, по меньшей мере, два гена *IND*, в частности *Brassica napus*, таким образом, мутантные аллели представляют собой мутантные аллели 2 различных генов *IND* в этом растении *Brassica*, в частности генов *IND-A1* и/или *IND-C1*. Такие мутантные растения могут быть использованы по данному изобретению с целями бридинга. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения предлагается в данном документе гомозиготное по гену *IND* растение *Brassica napus* с одной мутацией, где генотип растения может быть описан как *ind-al/ind-al*, *IND-C1/IND-C1* или *IND-A1/IND-A1*, *ind-cl/ind-cl*. В другом варианте осуществления изобретения предлагается в данном документе гомозиготное по гену *IND* растение - двойной мутант *Brassica napus*, где генотип растения может быть описан как *ind-al/ind-al*, *ind-cl/ind-cl*.

В дополнительном аспекте изобретения гомозиготное по гену *IND* растение вида *Brassica* с одной ( $n = 2$ ) мутацией, содержащее, по меньшей мере, два гена *IND*, в частности *Brassica napus*, содержит дополнительный мутантный аллель *IND*, где мутантное растение гетерозиготно по дополнительному мутантному аллелю *IND* (т.е.  $n = 3$ ), и где мутантный аллель представляет собой мутантный аллель оставшегося гена *IND* дикого типа в этом растении рода *Brassica*, в частности гена *IND-A1* или *IND-C1*. Таким образом, в дополнительном варианте осуществления изобретения предлагается в данном документе гомозиготное по гену *IND* растение *Brassica napus* с единичной мутацией, содержащее один дополнительный мутантный аллель *IND*, где генотип растения может быть описан как *ind-al/ind-al*, *IND-C1/ind-cl* или *IND-A1/ind-al*, *ind-cl/ind-cl*.

Дополнительно в данном документе предлагаются последовательности нуклеиновых кислот генов/аллелей *IND* дикого типа или мутантных растения рода *Brassica*, а также белки *IND* дикого типа и мутантные. Также изобретение относится к способам получения и комбинирования аллелей *IND* мутантных и дикого типа в растениях *Brassica*, а также к растениям *Brassica* и частям растений, содержащим специфические комбинации аллелей *IND* дикого типа и мутантных в своем геноме, благодаря чему в этих растениях снижается осыпание семян. Применение этих растений для переноса мутантных аллелей *IND* в другие растения также представляет собой один из вариантов осуществления изобретения, поскольку предлагаются растительные продукты какого-либо из описанных растений. Кроме того, изобретение охватывает наборы и способы селекции с помощью маркера (MAS) для комбинирования или определения генов и/или аллелей *IND*. Каждый из вариантов осуществления изобретения подробно описывается в данном документе ниже.

Растения *Brassica*, описанные в данном документе, у которых наблюдается снижение или задержка осыпания семян, дают повышенный урожай собранных семян. Тем не менее, неожиданно было обнаружено, что собранный урожай семян растений *Brassica*, содержащих лишь два мутантных аллеля *IND* в гомозиготном состоянии, т.е. у которых генотип растения может быть описан как *ind-al/ind-al*, *IND-C1/IND-C1* или *IND-A1/IND-A1*, *ind-cl/ind-cl*, также значительно увеличивался по сравнению с изогенными растениями *Brassica*, не содержащими мутантных аллелей *IND*, несмотря на отсутствие фенотипа с ощутимым снижением или задержкой осыпания семян у растений *Brassica*, содержащих данные мутантные аллели *IND*. Изобретение, таким образом, также относится к растениям *Brassica*, содержащим по меньшей мере два гена *IND*, в которых по меньшей мере два аллеля продуцируют функциональный белок *IND*, эти растения дают более высокий урожай семян. Должно быть понятно, что два мутантных аллеля в локусе *IND-A* или в локусе *IND-C* могут представлять собой один и тот же мутантный аллель или отличные мутантные аллели.

### Последовательности нуклеиновых кислот по изобретению

Изобретение охватывает как последовательности нуклеиновых кислот IND дикого типа, кодирующие функциональные белки IND, так и последовательности нуклеиновых кислот мутантного ind (содержащие одну или несколько мутаций, предпочтительно мутаций, которые приводят к отсутствию или значительно сниженной биологической активности кодируемого белка IND, или к отсутствию продукции белка IND) генов IND растений семейства Brassicaceae, конкретно рода Brassica, особенно Brassica napus, но также и других сельскохозяйственных видов рода Brassica. Например, виды Brassica, содержащие ген A и/или C, могут содержать различные аллели генов IND-A или IND-C, которые могут быть идентифицированы и объединены в одном растении по изобретению. Кроме того, для создания мутаций в аллелях IND дикого типа могут быть использованы способы мутагенеза, таким образом создавая мутантные ind для применения по изобретению. Поскольку специфические аллели IND предпочтительным образом комбинируют в одном растении с помощью скрещивания и селекции, в одном из вариантов осуществления предлагаются последовательности нуклеиновой кислоты IND и/или ind в растении (т.е. эндогенно), например, растения рода Brassica, предпочтительно растения рода Brassica, которое может быть скрещено с Brassica napus или которое может быть использовано для создания "искусственного" растения Brassica napus. Гибридизация между различными видами рода Brassica описывается в данной области, например, как изложено в статье Snowdon (2007, Chromosome research 15: 85-95). Межвидовая гибридизация может быть использована, например, для переноса генов из, например, генома C в растение B. napus (AACC) в генотип C в растении B. carinata (BBCC) или даже, например, из генома C в растение B. napus (AACC) в генотип B в растении B. juncea (AABB) (за счет случайного процесса незаконной рекомбинации между их C и B геномами). "Ресинтезированные" или "искусственные" линии Brassica napus могут быть получены скрещиванием исходных предков, B. oleracea (CC) и B. rapa (AA). Препятствия межвидовой, а также межродовой несовместимости в скрещиваниях между сельскохозяйственными видами рода Brassica и их родственными видами могут быть успешно преодолены, например, с помощью методик эмбрионального спасения или слияния протопластов (см., например, статью Snowdon, выше).

Тем не менее, в данном документе также предлагаются выделенные последовательности нуклеиновых кислот IND и ind (например, выделенные из растения путем клонирования или созданные искусственно с помощью синтеза ДНК), а также их варианты и фрагменты любого из них, поскольку их можно использовать для определения, какая последовательность присутствует эндогенно в растении или части растения, кодирует ли последовательность функциональный, нефункциональный белок или не кодирует белок (например, посредством экспрессии в рекомбинантной клетке-хозяине, как описано ниже) и для отбора и переноса специфических аллелей из одного растения в другое с целью создания растения, обладающего желаемым сочетанием функциональных и мутантных аллелей.

Последовательности нуклеиновых кислот IND-A1 и IND-C1 были выделены из Brassica napus, как показано в списке последовательностей. Представлены последовательности IND дикого типа, тогда как мутантные последовательности ind этих последовательностей и последовательностей, по существу им аналогичных, описываются в данном документе ниже и в примерах со ссылкой на последовательности IND дикого типа. Геномная ДНК растения Brassica napus, кодирующая белок IND, не содержит никаких интронов.

"Последовательности нуклеиновой кислоты IND-A1" или "последовательности нуклеиновой кислоты варианта IND-A1" по изобретению представляют собой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 98, 99 или 100% гомологией последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2, или последовательности нуклеиновых кислот, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% гомологией последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5. Эти последовательности нуклеиновых кислот также могут обозначаться как являющиеся "по существу аналогичными" или "по существу гомологичными" последовательностям IND, предлагаемым в списке последовательностей.

"Последовательности нуклеиновой кислоты IND-C1" или "последовательности нуклеиновой кислоты варианта IND-C1" по изобретению представляют собой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 98, 99 или 100% гомологией последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 4 (IND-C1-long) или с последовательностью SEQ ID NO: 4 от аминокислоты в положении 16 до аминокислоты в положении 210 (IND-C1-short), или последовательности нуклеиновой кислоты, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% гомологией последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 3 (IND-C1-long) или с последовательностью SEQ ID NO: 3 от нуклеотида в положении 46 до нуклеотида в положении 633 (IND-C1-short) или с последовательностью SEQ ID NO: 7. Эти последовательности нуклеиновых кислот также могут обозначаться как являющиеся "по существу аналогичными" или "по существу гомологичными" последовательностям IND, предлагаемым в списке последовательностей.

Таким образом, изобретение относится к обеим последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки дикого типа, функциональные белки IND-A1 и IND-C1, включая их варианты и фрагменты (определенные дополнительно ниже), а также к мутантным последовательностям нуклеиновых кислот любой из них, благодаря чему мутация в последовательности нуклеиновой кислоты предпочтительно приводит к одной или нескольким аминокислотам, встроенным, удаленным или замещенным, по сравнению с белком IND дикого типа. Предпочтительно мутация(и) в последовательности нуклеиновой кислоты приводит(ят) к одной или нескольким аминокислотным заменам (т.е. по отношению к аминокислотной последовательности дикого типа одна или несколько аминокислот встраиваются, удаляются и/или замещаются), вследствие чего биологическая активность белка IND значительно уменьшается или полностью устраняется. Значительное снижение или полное устранение биологической активности белка IND относится в данном документе к уменьшению или устранению ДНК-связывающей активности, способности димеризоваться и/или регулирующей транскрипцию активности белка IND, так что устойчивость к раскрытию стручка у растения, экспрессирующего мутантный белок IND, повышается по сравнению с растением, экспрессирующим соответствующий белок IND дикого типа.

Для определения функциональности специфического аллеля/белка IND в растениях, в частности в растениях рода *Brassica*, может быть определен уровень устойчивости к раскалыванию стручка у растений путем осуществления макроскопических, микроскопических и гистологических исследований на плодах и цветках растений, содержащих специфический аллель/белок IND, и соответствующих растений дикого типа, аналогичных исследованиям, осуществленным на плодах и цветках растения *Arabidopsis*, описанным авторами Liljegren et al. (2004, выше) или описанным в примерах ниже. Вкратце, изменения в устойчивости к раскалыванию стручка могут быть оценены и/или измерены, например, посредством макроскопических тестов, таких как осмотр семенных стручков невооруженным глазом для оценки, например, наличия или отсутствия краев створок, длины носика стручков и т.д.; тест удара рукой (MIT) для сравнения уровня устойчивости к раскрытию стручка между различными линиями, мутантными по IND, и соответствующими линиями дикого типа путем оценки легкости раскрытия стручка при осторожном скручивании стручков; тест случайного удара (RIT) для сравнения обмолачиваемости семенных стручков растений различных линий, мутантных по IND, и соответствующих линий дикого типа, соответственно, измеряя период полужизни образцов стручков этих линий; и/или посредством микроскопических тестов для оценки, например, влияют ли и каким образом мутации в гене IND на клетки по краю створок и в зоне раскрытия семенных стручков. После того как идентифицируют и охарактеризуют партнера по димеризации белка IND (например, самого белка IND в случае, если его функционирование зависит от образования гомодимера, или другого белка в случае, если его функционирование зависит от образования гетеродимера) и/или ген(ы), транскрипция которого(ых) регулируется белком IND, функциональность специфического аллеля/белка IND может быть оценена иначе с помощью методик рекомбинантных ДНК, известных в данной области, например, коэкспрессией обоих партнеров димера в клетке-хозяине (например, бактерии, такой как *E. coli*) и оценкой того, могут ли димеры все-таки быть образованы, могут ли димеры все-таки связываться с сайтом связывания bHLH регуляторного(ых) гена(ов), и/или регулируется ли еще транскрипция данного(ых) гена(ов) этим связыванием.

В данном документе предлагаются как эндогенные, так и выделенные последовательности нуклеиновых кислот. Также предлагаются фрагменты последовательностей IND и вариантных последовательностей нуклеиновых кислот IND, определенных выше, для применения в качестве праймеров или зондов и в качестве компонентов наборов по другому аспекту изобретения (см. дополнительно ниже). "Фрагмент" последовательности нуклеиновой кислоты IND или ind или его вариант (определенный) может иметь различную длину, такую как, по меньшей мере, 10, 12, 15, 18, 20, 50, 100, 200, 500, 600 последовательных нуклеотидов последовательности IND или ind (или вариантной последовательности).

#### **Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие функциональные белки IND**

Последовательности нуклеиновых кислот, представленные в списке последовательностей, кодируют функциональные белки IND дикого типа растений *Brassica napus*. Таким образом, эти последовательности являются эндогенными для растений *Brassica napus*, из которых их выделяют. Другие сельскохозяйственные культуры рода *Brassica*, сорта, линии скрещивания или дикие изоляты могут быть скринированы в отношении других аллелей IND, кодирующих те же белки IND или их разновидности. Например, для идентификации аллелей IND, эндогенных для других растений рода *Brassica*, таких как различные сорта, линии или изоляты *Brassica napus*, а также *Brassica juncea* (особенно аллелей IND в А-геноме), *Brassica carinata* (особенно аллелей IND в С-геноме), могут быть использованы методики гибридизации нуклеиновых кислот (например, анализ саузерн-блот, используя, например, жесткие условия гибридизации) или методики ПЦР, и растения, органы и ткани *Brassica rapa* (А-геном) и *Brassica oleracea* (С-геном) могут быть скринированы в отношении других аллелей IND дикого типа. Для скрининга таких растений, органов или тканей растений на наличие аллелей IND могут быть использованы последовательности нуклеиновых кислот IND, предлагаемые в списке последовательностей, или варианты или фрагменты какой-либо из них. Например, целые последовательности или фрагменты могут быть использованы в качестве зондов или праймеров. Например, специфические или вырожденные праймеры могут быть использованы для амплификации последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих белки IND, из

геномной ДНК растения, органа или ткани растения. Эти последовательности нуклеиновых кислот IND могут быть выделены и секвенированы, используя стандартные молекулярно-биологические техники. Для характеристики аллеля(ей) затем может быть использован биоинформационный анализ, например, для определения, у какого аллеля IND последовательность соответствует данной последовательности и какой белок IND или разновидность белка кодируется данной последовательностью.

Кодирует ли последовательность нуклеиновой кислоты функциональный белок IND, можно проанализировать с помощью техник рекомбинантных ДНК, известных в данной области, например, с помощью теста генетической комплементарности, используя, например, растение *Arabidopsis*, которое гомозиготно по мутантному аллелю IND с полным нокаутом, или растение *Brassica napus*, которое гомозиготно по мутантному аллелю *ind* с полным нокаутом обоих генов IND-A1 и IND-C1.

Кроме того, понятно, что последовательности нуклеиновых кислот IND и их варианты (или фрагменты какой-либо из них) могут быть идентифицированы с помощью компьютерного моделирования путем скрининга баз данных нуклеиновых кислот в отношении по существу аналогичных последовательностей. Подобным же образом последовательность нуклеиновой кислоты может быть синтезирована химическим путем. Также предлагаются фрагменты молекул нуклеиновых кислот по изобретению, которые описываются дополнительно ниже. Фрагменты включают последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие лишь домен bHLH, или меньшие фрагменты, содержащие часть домена bHLH, такую как основной домен или домен HLH и т.д.

### **Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие мутантные белки IND**

Последовательности нуклеиновых кислот, содержащие одну или несколько делеций, инсерций или замен нуклеотидов относительно последовательностей нуклеиновых кислот дикого типа представляют собой другой вариант осуществления изобретения, поскольку представляют собой фрагменты таких мутантных молекул нуклеиновых кислот. Такие мутантные последовательности нуклеиновых кислот (обозначаемые как последовательности *ind*) могут быть созданы и/или идентифицированы, используя большое число известных способов, описанных дополнительно ниже. В свою очередь такие молекулы нуклеиновых кислот предлагаются как в эндогенной форме, так и в выделенной форме. В одном из вариантов осуществления мутация(и) приводит(ят) к одному или нескольким изменениям (делециям, инсерциям и/или заменам) в аминокислотной последовательности кодируемого белка IND (т.е. она не является "молчащей мутацией"). В другом варианте осуществления мутация(и) в последовательности нуклеиновой кислоты приводит(ят) к значительно сниженной или полностью отсутствующей биологической активности кодируемого белка IND по сравнению с белком дикого типа.

Молекулы нуклеиновых кислот могут, таким образом, содержать одну или несколько мутаций, таких как:

- (а) "миссенс-мутация", которая представляет собой изменение в последовательности нуклеиновой кислоты, которое приводит к замене одной аминокислоты на другую аминокислоту;
- (б) "нонсенс-мутация" или "мутация стоп-кодона", которая представляет собой изменение в последовательности нуклеиновой кислоты, которое приводит к встраиванию преждевременного стоп-кодона и, таким образом, терминации трансляции (приводя к усеченному белку); гены растений содержат кодоны, останавливающие трансляцию, "TGA" (UGA в РНК, "TAA" (UAA в РНК) и "TAG" (UAG в РНК); таким образом, любая нуклеотидная замена, инсерция, делеция, которая приводит к появлению одного из этих кодонов в зрелой транскрибируемой мРНК (в рамке считывания) будет останавливать трансляцию.
- (с) "мутация в виде инсерции" одной или нескольких аминокислот из-за одного или нескольких кодонов, добавленных в кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты;
- (d) "мутация в виде делеции" одной или нескольких аминокислот из-за одного или нескольких кодонов, удаленных из кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты;
- (е) "мутация со сдвигом рамки считывания", приводящая к последовательности нуклеиновой кислоты, транскрибируемой в отличной рамке ниже мутации. Мутация со сдвигом рамки считывания может иметь различные причины, такие как инсерция, делеция или дупликация одного или нескольких нуклеотидов.

Как уже упоминалось, желательно, чтобы мутация(и) в последовательности нуклеиновой кислоты предпочтительно приводила(и) к мутантному белку, обладающему значительно сниженной биологической активностью или не имеющему ее *in vivo* или к отсутствию продукции белка. В основном, любая мутация, которая приводит к появлению белка, содержащего, по меньшей мере, инсерцию, делецию и/или замену одной аминокислоты относительно белка дикого типа, может приводить к значительно сниженной биологической активности или ее отсутствию. Тем не менее, понятно, что мутации в некоторых частях белка скорее приведут к сниженной функции мутантного белка IND, такие как мутации, приводящие к усеченным белкам, вследствие чего значительные части функциональных доменов, таких как ДНК-связывающий домен ("b"), домен димеризации ("HLH") и/или регулирующие транскрипцию домены, теряются.

Согласно базе данных информационного ресурса по *Arabidopsis* (TAIR) (<http://www.Arabidopsis.org/>) белок INDEHISCENT растения *Arabidopsis* (локус At4g00120.1; SEQ ID NO: 10) составляет 198 аминокислот в длину и содержит основной домен димеризации "спираль-петля-спираль" (bHLH), расположенный между аминокислотами в положении 121 и 168 (домен PF00010 из базы



данных pfam), между аминокислотами в положении 124 и 173 (домен SM00353 из базы данных smart) или между аминокислотами в положении 112 и 168 (домен PS50888 из базы данных prosite), и ДНК-связывающий домен "спираль-петля-спираль (HLH)" между аминокислотами в положении 114 и 196 или 198 (домен G3D.4.10.280.10 или SSF47459, соответственно, базы данных superfam) последовательности SEQ ID NO: 10.

Белок IND-A1 растения Brassica, описанный в данном документе, составляет около 185 аминокислот в длину (SEQ ID NO:2) и белок IND-C1 составляет около 195 (SEQ ID NO:4 от аминокислоты в положении 16 до 210) или 210 (SEQ ID NO:4) аминокислот, и они содержат основной домен димеризации "bHLH", локализованный между аминокислотами в положении 120 и 167 в последовательности SEQ ID NO: 2 и между аминокислотами в положении 133 и 180 в SEQ ID NO: 4 (домен PF00010 pfam), между аминокислотами в положении 123 и 172 в SEQ ID NO: 2 и между аминокислотами в положении 136 и 185 в SEQ ID NO: 4 (домен SM00353 smart), или между аминокислотами в положении 111 и 167 в SEQ ID NO: 2 и между аминокислотами в положении 124 и 180 в SEQ ID NO: 4 (домен PS50888 prosite) и ДНК-связывающий домен "HLH" между аминокислотами в положении 127 и 208 или 210 в SEQ ID NO: 4 (домен superfam G3D.4.10.280.10 или SSF47459, соответственно), определенные оптимальным выравниванием белков IND растений Brassica и Arabidopsis и на основании информации аннотации в базе данных TAIR.

Как описывается авторами Heim et al. (2003, Mol Biol Evol 20, 735-747), консенсусная последовательность домена bHLH 133 генов факторов транскрипции, содержащих bHLH, растений Arabidopsis состоит из примерно 56 аминокислот (Heim et al., фиг. 1; соответствующих положению 119-174 в последовательности SEQ ID NO: 10). Этот состоящий из двух частей домен содержит (1) основной участок, локализованный на N-терминальном конце домена, который вовлечен в связывание ДНК и состоит из около 13 аминокислот с большим числом основных остатков ("b"; соответствующий положению 119-131 в SEQ ID NO: 10), и (2) участок спираль-петля-спираль, расположенный на C-терминальном конце, который функционирует в качестве домена димеризации и составлен из около 43 главным образом гидрофобных аминокислотных остатков (соответствующий положению 132-174 в SEQ ID NO: 10), которые образуют две амфипатические альфа-спирали из около 15 аминокислот ("H1"; соответствующую положению 132-146 в SEQ ID NO: 10) и 22 аминокислот ("H2"; соответствующую положению 153-174 в SEQ ID NO: 10), соответственно, отделенные петлевым участком от около 6 и до около 14 аминокислот ("L"; соответствующим положению 147-152 в SEQ ID NO: 10), который представляет собой самый различающийся участок домена bHLH с точки зрения размера и аминокислотного состава. Две альфа-спирали усиливают димеризацию, давая возможность образования гомо- и/или гетеродимеров между различными членами семейства (Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15: 1749-1770). Поскольку домен bHLH эволюционно консервативен (Atchley and Fitch, 1997, PNAS 94: 5172-5176), существует небольшое подобие последовательностей между различными членами семейства bHLH за пределами этого домена (Morgenstern и Atchley, 1999, Mol Biol Evol 16: 1654-1663).

В этих белках, содержащих bHLH, с доказанной способностью связываться с ДНК самыми важными являются аминокислоты в положении 5, 9 и 13 консенсусной последовательности домена bHLH, определенной авторами Heim et al. (выше). Для нерастительных белков bHLH было показано, что остаток His (H) в положении 5, остаток Glu (E) в положении 9 и остаток Arg (R) в положении 13 (все в основном участке) оказались решающими для связывания ДНК (Brownlie et al., 1997, Structure 5, 509-520; Atchley et al., 1999, J Mol Evol 48, 501-516; Ledent и Vervoort, 2001, Genome Res 11, 754-770). Тем не менее, некоторые растительные белки имеют вариацию конфигурации H-E-R.

Например, согласно статье Heim et al. (выше), мотив 5-9-13 домена bHLH, кодируемый геном At4g00120 Arabidopsis (соответствующий гену IND Arabidopsis, представленному в SEQ ID NO: 9), состоит из аминокислотных остатков Gin (Q), Ala (A) и Arg (R), соответственно (соответствующих положениям 123, 127 и 131, соответственно, в SEQ ID NO: 10) (фиг. 4 статьи Heim et al. (выше). Такие растительные белки, которые имеют вариацию конфигурации H-E-R, могут дополнительно содержать в основном участке пролины, разрушающие спираль, например, члены группы VIII и X, характеристики которых могут влиять на сродство ДНК. Эти вариации могут давать возможность данным белкам действовать в качестве отрицательных регуляторов, сохраняя способность димеризоваться с другими белками, содержащими bHLH, но утрачивая способность связываться с ДНК. Несмотря на то, что мотив 5-9-13 важен для связывания с ДНК, остов ДНК приводится в контакт посредством основных остатков в положениях 10 и 12 (оба остатка Arg (R) в консенсусной последовательности домена bHLH), которые также консервативны у большинства растительных белков (соответствующие положениям 128 и 130 в SEQ ID NO: 10).

Более того, авторы Heim et al. (выше) описывают, что для димеризации или стабилизации образования димера необходимы высоко консервативные гидрофобные остатки в положении 16, 20, 23, 27 в спирали 1 (соответствующие положению 134, 138, 141, 145 в SEQ ID NO: 10) и в положении 36, 39, 43, 49, 53 и 56 в спирали 2 (соответствующие положению 154, 157, 161, 167, 171, 174 в SEQ ID NO: 10), например, остаток лейцина в положении 23 в домене спирали 1 (соответствующий положению 141 в SEQ ID NO: 10) и консервативные гидрофобные остатки в спирали 2, которые расположены с одной стороны



спирали.

В заключение, Heim et al. (выше; фиг. 4) указывают на консервативные аминокислотные последовательности вне ДНК-связывающего домена, полагая, что некоторые из них действуют в качестве домена активации или важны для взаимодействия с другими элементами транскрипционного комплекса или являются мишенями цепей сигнальной трансдукции.

Таблица 1. Белки IND - участки и положения аминокислот (AA)

		AtIND1 (SEQ ID NO: 10)	AtIND1 (SEQ ID NO: 9)	BnIND-A1 (SEQ ID NO: 2/6)	BnIND- C1a/b (SEQ ID 4/8 от 16- 210/SEQ ID 4/8)
<u>Кодиру-</u> <u>емый</u> <u>участок</u>	<u>TAIR:</u>  PF00010 SM00353 PS50888 G3D.4.10.280.10 SSF47459 <u>Liljegren et al.</u>	1-198 (198 AA)  121-168 124-173 112-168 114-196 114-198 30-198 (169 AA)	1-594  361-504 370-519 334-504 340-588 340-594 88-594	1-185 (185 AA)  120-167 123-172 111-167 - - -	16-210/1- 210 (195/210 AA) 133-180 136-185 124-180 127-208 127-210
<u>bHLH:</u>	<u>Heim et al.</u> <u>Toledo-Ortiz et al.</u> <u>Liljegren et al.</u>	119-174 115-167 119-167	355-523 343-501 355-501	118-173 114-166 118-166	131-186 127-179 131-179
b	Heim et al. Toledo-Ortiz et al. Liljegren et al.	119-131 115-131 119-131	355-393 343-393 355-393	118-132 114-132 118-132	131-145 127-145 131-145
H1	Heim et al. Toledo-Ortiz et al. Liljegren et al.	132-146 132-146 132-145	394-438 394-438 394-435	133-145 133-145 133-144	146-158 146-158 146-157
L	Heim et al. Toledo-Ortiz et al. Liljegren et al.	147-152 147-152 146-152	439-456 439-456 436-456	146-151 146-151 145-151	159-164 159-164 158-164
H2	Heim et al. Toledo-Ortiz et al. Liljegren et al.	153-174 153-167 153-167	457-523 457-501 457-501	152-173 152-166 152-166	165-186 165-179 165-179

Консервативные АА	N (1 <sup>T</sup> )	115	343-345	114	127
	V (2 <sup>T</sup> )	116	346-348	115	128
	Q (5 <sup>H</sup> )	123	367-379	122	135
	A (9 <sup>H</sup> -13 <sup>T</sup> )	127	379-381	126	139
	R (10 <sup>H</sup> -14 <sup>T</sup> )	128	382-384	127	140
	R (12 <sup>H</sup> -16 <sup>T</sup> )	130	388-390	129	142
	R (13 <sup>H</sup> )	131	391-393	130	143
	I (16 <sup>H</sup> -20 <sup>T</sup> )	134	400-403	133	146
	S (21 <sup>T</sup> )	135	404-406	134	147
	I (20 <sup>H</sup> -24 <sup>T</sup> )	138	412-414	137	150
	L (23 <sup>H</sup> -27 <sup>T</sup> )	141	421-423	140	153
	K (28 <sup>T</sup> )	142	424-426	141	154
	V (27 <sup>H</sup> )	145	433-435	144	157
	K (39 <sup>T</sup> )	150	448-450	149	162
	T (42 <sup>T</sup> )	153	460-463	152	165
	A (36 <sup>H</sup> )	154	460-462	153	166
	M (45 <sup>T</sup> )	156	466-468	155	168
	L (39 <sup>H</sup> -46 <sup>T</sup> )	157	469-471	156	169
	A (49 <sup>T</sup> )	160	478-480	159	172
	I (43 <sup>H</sup> -50 <sup>T</sup> )	161	481-483	160	173
	Y (52 <sup>T</sup> )	163	487-489	162	175
	T (53 <sup>T</sup> )	164	490-492	163	176
	L (49 <sup>H</sup> -56 <sup>T</sup> )	167	499-501	166	179
	V (53 <sup>H</sup> )	171	511-513	170	183
	L (56 <sup>H</sup> )	174	580-582	173 (A)	186
<i>At</i> <i>IND</i>	<i>ind-5</i> (W13>STOP) <sup>L</sup>	42	124-126	25	41
	<i>ind-2</i> (A26>FS) <sup>L</sup>	55	163-165	-	-
	<i>ind-6</i> <sup>W</sup>	Инсерция после 61	Инсерция после 185	-	-
	<i>ind-4</i> (Q63>STOP) <sup>L</sup>	92	274-276	91	104
	<i>ind-3</i> (R99>H) <sup>L</sup>	128	382-384	127	140
	<i>ind-1</i> (L112>F) <sup>L</sup>	141	421-423	140	153

Heim et al., <sup>H</sup>: Heim et al., 2003, Mol Biol Evol 20, 735-747; Toledo-Ortiz et al., <sup>T</sup>: Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15: 1749-1770; Liljegren et al., <sup>L</sup>: Liljegren et al., 2004, Cell, 116, 843-853; <sup>W</sup>: Wu et al., 2006, Planta 224, 971-979.

Аналогично, как описано авторами Toledo-Ortiz et al. (2003, Plant Cell 15: 1749-1770; фиг. 1), домен bHLH семейства факторов транскрипции, содержащих bHLH, растения *Arabidopsis* состоит из примерно 56 аминокислот (Toledo-Ortiz et al.; соответствующих положению 115-167 в SEQ ID NO: 10). Этот состоящий из двух частей домен содержит (1) основной участок, расположенный на N-терминальном конце домена, который вовлечен в связывание ДНК и состоит из около 17 аминокислот с большим количеством основных остатков ("b"; соответствующих положению 115-131 в SEQ ID NO: 10), и (2) участок HLH, расположенный на C-терминальном конце, который функционирует как домен димеризации и составлен из около 39 главным образом гидрофобных аминокислотных остатков (соответствующих положению 132-167 в SEQ ID NO: 10), которые образуют две амфипатических альфа-спирали из около 15 аминокислот ("H1", соответствующую положению 132-146 в SEQ ID NO: 10, и "H2", соответствующую положению 152-167 в SEQ ID NO: 10), разделенных петлевым участком из около 9 аминокислот ("L"; соответствующим положению 147-151 в SEQ ID NO: 10), который представляет собой самый дивергентный участок домена bHLH с точки зрения размера и аминокислотного состава.

На основе паттернов консервации последовательностей авторы Atchley et al. (1999) создали теоретический консенсусный мотив, представляющий самые консервативные аминокислоты в участке bHLH, включающий 19 аминокислот, распределенных по домену bHLH (18 из b, H1 и H2; 1 из L). Идентифицированные консервативные аминокислоты соответствуют аминокислотам в положении 1, 2, 13, 14, 16 (в b); 20, 21, 24, 27, 28 (в H1); 39 (в L); 42, 45, 46, 49, 50, 52, 53, и 56 (в H2) домена bHLH *Arabidopsis*, определенного авторами Toledo-Ortiz et al. (2003, выше), которые соответствуют аминокислотам в положении 115, 116, 127, 128, 130 (в b); 134, 135, 138, 141, 142 (в H1); 150 (в L); 153, 156, 157, 160, 161, 163, 164 и 167 (в H2) последовательности SEQ ID NO: 10.

Согласно статье Liljegren et al. (2004, Cell, 116, 843-853) домен bHLH гена IND растения *Arabidopsis* содержит основной участок из 13 аминокислот (SEQ ID NO: 10 от аминокислоты в положении 119 до

131) и две альфа-спирали из 14 и 15 аминокислот, соответственно (SEQ ID NO: 10 от аминокислоты в положении 132-145 и от аминокислоты в положении от 153 до 167, соответственно), разделенные вариабельным петлевым участком из 7 аминокислот (SEQ ID NO: 10 от аминокислоты в положении 146-152).

Оптимальное выравнивание последовательностей нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 9) и аминокислот (SEQ ID NO: 10) IND растения *Arabidopsis* с последовательностями нуклеиновой кислоты IND, в частности последовательностями нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 1 и 3) и аминокислот (SEQ ID NO: 2 и 4) IND растения рода *Brassica* по настоящему изобретению, позволяет определить положение соответствующих консервативных доменов и аминокислот в этих последовательностях растения *Brassica* (см. табл. 1 в отношении последовательностей IND *Brassica* SEQ ID NO: 1-4).

Таким образом, в одном из вариантов осуществления предлагаются последовательности нуклеиновых кислот, содержащие один или несколько каких-либо типов мутаций, описанных выше. В другом варианте осуществления предлагаются последовательности ind, содержащие одну или несколько мутаций стоп-кодона (нонсенс), одну или несколько миссенс-мутаций и/или одну или несколько мутаций со сдвигом рамки считывания. Любые из указанных выше мутантных последовательностей нуклеиновых кислот предлагаются в чистом виде (в выделенной форме), в виде растений или частей растений, содержащих такие последовательности эндогенно. В таблицах в данном документе ниже описываются самые предпочтительные аллели ind, и запасы семян растения *Brassica napus*, содержащих один или несколько аллелей ind, были депонированы, как указано.

Используемая в данном документе нонсенс-мутация в аллеле IND представляет собой мутацию в аллеле IND, благодаря которой в кодирующую ДНК и соответствующую последовательность мРНК соответствующего аллеля IND дикого типа встраиваются один или несколько стоп-кодонов трансляции. Стоп-кодоны трансляции представляют собой TGA (UGA в мРНК), TAA (UAA) и TAG (UAG). Таким образом, любая мутация (делеция, инсерция или замена), которая приводит к созданию стоп-кодона внутри рамки в кодирующей последовательности, будет приводить к терминции трансляции и усечению аминокислотной цепи. В одном из вариантов осуществления мутантный аллель IND, содержащий нонсенс-мутацию, представляет собой аллель IND, в котором в последовательность кодонов IND встраивается стоп-кодон без сдвига рамки считывания посредством однонуклеотидной замены, такой как мутация CAG в TAG, TGG в TAG, TGG в TGA или CAA в TAA. В другом варианте осуществления мутантный аллель IND, содержащий нонсенс-мутацию, представляет собой аллель IND, в котором в последовательность кодонов IND встраивают стоп-кодон без сдвига рамки с помощью двухнуклеотидных замен, таких как мутация CAG в TAA, TGG в TAA или CGG в TAG или TGA. В еще одном варианте осуществления мутантный аллель IND, содержащий нонсенс-мутацию, представляет собой аллель IND, в котором в последовательность кодонов IND встраивают стоп-кодон без сдвига рамки с помощью трехнуклеотидных замен, таких как мутация CGG в TAA. Усеченный белок теряет аминокислоты, кодируемые кодирующей ДНК ниже мутации (т.е. С-терминальную часть белка IND) и сохраняет аминокислоты, кодируемые кодирующей ДНК выше мутации (т.е. N-терминальную часть белка IND). В одном из вариантов осуществления мутантный аллель IND, содержащий нонсенс-мутацию, представляет собой аллель IND, в котором нонсенс-мутация присутствует где-либо впереди от консервативного остатка Leu домена H2 (в положении 56 в консенсусной последовательности домена bHLH, описанной авторами Heim et al., 2003, см. выше), так что теряется, по меньшей мере, консервативный остаток Leu. Мутантный белок IND является более усеченным по сравнению с белком IND дикого типа, большее усечение может привести к значительному снижению или отсутствию активности белка IND. Таким образом, в другом варианте осуществления предлагается мутантный аллель IND, содержащий нонсенс-мутацию, которая приводит к усеченному белку длиной менее чем около 170 аминокислот (нехватка консервативного Leu), менее чем около 150 аминокислот (нехватка домена H2), менее чем около 145 аминокислот (нехватка доменов L и H2), менее чем около 130 аминокислот (нехватка домена HLH), менее чем около 115 аминокислот (нехватка домена bHLH), или даже меньше аминокислот в длину, такой как мутантные аллели IND, соответствующие аллелям ind-4 или ind-5 растения *Arabidopsis* (Liljegren et al., 2004, выше) (см. табл. 1).

В таблицах в данном документе ниже описывается диапазон возможных нонсенс-мутаций в последовательностях IND *Brassica napus* IND, предложенных в данном документе.

Таблица 2а. Возможные мутации стоп-кодона в IND-A1 (SEQ ID NO: 1)

Положение аминокислоты	Положение нуклеотида	Кодон дикого типа → мутантный	Аминокислота дикого типа → мутантная
25	74	<u>t</u> gg → t <u>a</u> g	TRP → STOP
	75	t <u>g</u> g → t <u>g</u> a	TRP → STOP
	74+75	<u>t</u> gg → t <u>a</u> a	TRP → STOP
57	169	<u>c</u> ag → t <u>a</u> g	GLN → STOP
	169+171	<u>c</u> ag → t <u>a</u> a	GLN → STOP
91	271	<u>c</u> aa → t <u>a</u> a	GLN → STOP
98	292	<u>c</u> ag → t <u>a</u> g	GLN → STOP
	292+294	<u>c</u> ag → t <u>a</u> a	GLN → STOP
122	364	<u>c</u> ag → t <u>a</u> g	GLN → STOP (1)
	364+366	<u>c</u> ag → t <u>a</u> a	GLN → STOP
128	382+383	<u>c</u> gg → t <u>a</u> g	ARG → STOP
	382+384	<u>c</u> gg → t <u>g</u> a	ARG → STOP
	382+383+384	<u>c</u> gg → t <u>a</u> a	ARG → STOP
138	412+413	<u>c</u> gg → t <u>a</u> g	ARG → STOP
	412+414	<u>c</u> gg → t <u>g</u> a	ARG → STOP
	412+413+414	<u>c</u> gg → t <u>a</u> a	ARG → STOP
168	502+503	<u>c</u> gg → t <u>a</u> g	ARG → STOP
	502+504	<u>c</u> gg → t <u>g</u> a	ARG → STOP
	502+503+504	<u>c</u> gg → t <u>a</u> a	ARG → STOP
169	505	<u>c</u> ag → t <u>a</u> g	GLN → STOP
	505+507	<u>c</u> ag → t <u>a</u> a	GLN → STOP
181	542	t <u>g</u> g → t <u>a</u> g	TRP → STOP
	543	t <u>g</u> g → t <u>g</u> a	TRP → STOP
	542+543	t <u>g</u> g → t <u>a</u> a	TRP → STOP

(1) семена, содержащие мутантный аллель IND-A1, содержащий эту нонсенс-мутацию (обозначаемый в данном документе далее ind-a1-EMS01), были депонированы в Американской коллекции типовых культур (ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, US) 20 ноября 2007 под номером доступа PTA-8796.

Таблица 2b. Возможные мутации стоп-кодона в IND-C1 (SEQ ID NO: 3)

Положение аминокислоты	Положение нуклеотида	Кодон дикого типа → мутантный	Аминокислота дикого типа → мутантная
41	122	tgg → t <sup>g</sup> g	TRP → STOP
	123	tgg → tg <sup>a</sup>	TRP → STOP
	122+123	tgg → t <sup>aa</sup>	TRP → STOP
50	148	c <sup>a</sup> a → t <sup>a</sup> aa	GLN → STOP (2)
73	271	c <sup>a</sup> g → t <sup>a</sup> g	GLN → STOP
	271+272	c <sup>a</sup> g → t <sup>aa</sup>	GLN → STOP
104	310	c <sup>a</sup> a → t <sup>a</sup> aa	GLN → STOP
111	331	c <sup>a</sup> g → t <sup>a</sup> g	GLN → STOP
	331+333	c <sup>a</sup> g → t <sup>aa</sup>	GLN → STOP
135	403	c <sup>a</sup> g → t <sup>a</sup> g	GLN → STOP (3)
	403+405	c <sup>a</sup> g → t <sup>aa</sup>	GLN → STOP
141	421+422	c <sup>g</sup> g → t <sup>a</sup> g	ARG → STOP
	421+423	c <sup>g</sup> g → tg <sup>a</sup>	ARG → STOP
	421+422+423	c <sup>g</sup> g → t <sup>aa</sup>	ARG → STOP
151	451+452	c <sup>g</sup> g → t <sup>a</sup> g	ARG → STOP
	451+453	c <sup>g</sup> g → tg <sup>a</sup>	ARG → STOP
	451+452+453	c <sup>g</sup> g → t <sup>aa</sup>	ARG → STOP
181	541+542	c <sup>g</sup> g → t <sup>a</sup> g	ARG → STOP
	541+543	c <sup>g</sup> g → tg <sup>a</sup>	ARG → STOP
	541+542+543	c <sup>g</sup> g → t <sup>aa</sup>	ARG → STOP
182	544	c <sup>a</sup> g → t <sup>a</sup> g	GLN → STOP
	544+546	c <sup>a</sup> g → t <sup>aa</sup>	GLN → STOP
187	559	c <sup>a</sup> g → t <sup>a</sup> g	GLN → STOP
	559+561	c <sup>a</sup> g → t <sup>aa</sup>	GLN → STOP
191	571	c <sup>a</sup> g → t <sup>a</sup> g	GLN → STOP
	571+573	c <sup>a</sup> g → t <sup>aa</sup>	GLN → STOP

(2) семена, содержащие мутантный аллель IND-C1, содержащий эту нонсенс-мутацию (обозначаемый в данном документе далее ind-c1-EMS01), были депонированы в ATCC 20 ноября 2007 г. под номером доступа PTA-8796;

(3) семена, содержащие мутантный аллель IND-A1, содержащий эту нонсенс-мутацию (обозначаемый в данном документе далее ind-c1-EMS03), были депонированы в ATCC 20 ноября 2007 под номером доступа PTA-8795.

Очевидно, что мутации не ограничиваются представленными в таблицах выше, и понятно, что аналогичные стоп-мутаций могут присутствовать в аллелях IND, отличных от представленных в списке последовательностей и упомянутых в таблицах выше.

Используемая в данном документе миссенс-мутация в аллеле IND представляет собой любую мутацию (делецию, инсерцию или замену) в аллеле IND, благодаря которой в кодирующей ДНК и соответствующей последовательности мРНК соответствующего аллеля IND дикого типа изменяются один или несколько кодонов, что приводит к замене одной или нескольких аминокислот в белке IND дикого типа на одну или несколько других аминокислот в мутантном белке IND. В одном из вариантов осуществления мутантный аллель IND, содержащий миссенс-мутацию, представляет собой аллель IND, в котором одна или несколько консервативных аминокислот, указанных выше или в табл. 1, замещает(ют)ся. Как

указано выше, некоторые консервативные аминокислоты более важны для биологической активности белка IND, чем другие. Таким образом, миссенс-мутации, которые приводят к замене, например, аминокислот в положении 5, 9 и 13 или в положениях 10 и 12 консенсусной последовательности домена bHLH, определенной авторами Heim et al. (выше), более вероятно приведут к значительному снижению или отсутствию активности вследствие пониженной способности белка IND связываться с мишенной ДНК. Аналогично, миссенс-мутации, которые приводят к замене, например, аминокислот в положении 16, 20, 23, 27 в спирали 1 или в положениях 36, 39, 43, 49, 53 и 56 в спирали 2 консенсусной последовательности домена bHLH, определенной авторами Heim et al. (выше), более вероятно приведут к значительному снижению или отсутствию активности вследствие пониженной способности к димеризации белка IND. Семена, содержащие мутантный аллель IND-A1, содержащий миссенс-мутацию, которая вызывает замену остатка Arg в положении 10 консенсусной последовательности домена bHLH, определенной авторами Heim et al. (выше), на остаток His (далее в данном документе обозначаемый ind-a1-EMS05), были депонированы в ATCC 20 ноября 2007 под номером доступа PTA-8795. В другом варианте осуществления мутантный аллель IND, содержащий миссенс-мутацию, представляет собой аллель IND, содержащий миссенс-мутацию, соответствующую миссенс-мутации в аллелях ind-1 или ind-3 *Arabidopsis* (Liljegen et al., 2004, выше) (см. табл. 1).

Используемая в данном документе мутация со сдвигом рамки в аллеле IND представляет собой мутацию (делецию, инсерцию, дупликацию и подобное) в аллеле IND, которая приводит к последовательности нуклеиновой кислоты, транскрибируемой в отличной рамке ниже мутации. В одном из вариантов осуществления мутантный аллель IND, содержащий мутацию со сдвигом рамки, представляет собой аллель IND, содержащий мутацию со сдвигом рамки, соответствующую мутации со сдвигом рамки в аллеле IND-2 *Arabidopsis* (Liljegen et al., 2004, выше), в котором один нуклеотид в кодоне 26 удаляется, что приводит к сдвигу рамки и продукции усеченного белка из 35 аминокислот (согласно Liljegen et al., 2004, выше). В другом варианте осуществления мутантный аллель IND, содержащий мутацию со сдвигом рамки, представляет собой аллель IND, содержащий мутацию со сдвигом рамки, соответствующую мутации со сдвигом рамки в аллеле IND-6 *Arabidopsis* (Wu et al., 2006, выше), где после нуклеотида 183 встраивают транспозон Ds, что вызывает дупликацию 8 нуклеотидов в сайте инсерции, или соответствующим аллелям-ревертантам IND *Arabidopsis* (см. Wu et al., 2006, ранее, фиг. 1a).

#### **Аминокислотные последовательности по изобретению**

Изобретение охватывает как аминокислотные последовательности (функционального) белка IND дикого типа, так и аминокислотные последовательности мутантного белка IND (содержащие одну или несколько мутаций, предпочтительно мутаций, которые приводят к значительному снижению или отсутствию биологической активности белка IND) из растений семейства Brassicaceae, в частности рода *Brassica*, особенно *Brassica napus*, но также из других сельскохозяйственных видов *Brassica*. Например, вид рода *Brassica*, содержащий геном А и/или С, может кодировать различные аминокислоты IND-A или IND-C. Кроме того, для создания мутаций в аллелях IND дикого типа могут быть использованы способы мутагенеза, таким образом создавая мутантные аллели, которые могут кодировать дополнительные мутантные белки IND. В одном из вариантов осуществления предлагаются аминокислотные последовательности IND дикого типа и/или мутантного в растении рода *Brassica* (т.е. эндогенно). Тем не менее, в данном документе также предлагаются аминокислотные последовательности выделенного IND (например, выделенного из растения или созданного синтетически), а также их варианты и фрагменты любого из них.

Аминокислотные последовательности белков IND-A1 и IND-C1 были выделены из *Brassica napus*, как представлено в списке последовательностей. Представлены последовательности IND дикого типа, тогда как мутантные последовательности IND этих последовательностей и последовательностей, по существу аналогичных им, описываются в данном документе ниже со ссылкой на последовательности IND дикого типа.

Как описано выше, белки IND растения *Brassica*, описанные в данном документе, имеют около 185-210 аминокислот в длину и содержат большое число структурных и функциональных доменов.

"Аминокислотные последовательности IND-A1" или "вариативные аминокислотные последовательности IND-A1" по изобретению представляют собой аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 98, 99 или 100% гомологии последовательностей с последовательностью SEQ ID NO: 2. Эти аминокислотные последовательности также могут обозначаться как "по существу аналогичные" или "по существу идентичные" последовательностям IND, предлагаемым в списке последовательностей.

"Аминокислотные последовательности IND-C1" или "вариативные аминокислотные последовательности IND-C1" по изобретению представляют собой аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 98, 99 или 100% гомологии последовательностей с последовательностью SEQ ID NO: 4 (IND-C1-long) или с SEQ ID NO: 4 от аминокислоты в положении 16 до аминокислоты в положении 210 (IND-C1-short). Эти аминокислотные последовательности также могут обозначаться как "по существу аналогичные" или "по существу идентичные" последовательностям IND, предлагаемым в списке последова-

тельностью.

Таким образом, изобретение относится как к аминокислотным последовательностям дикого типа, функциональным белкам IND-A1 и IND-C1, включая их варианты и фрагменты (определенные дополнительно ниже), так и к мутантным аминокислотным последовательностям любой из них, следствием мутации в аминокислотной последовательности предпочтительно является значительное снижение или полное устранение биологической активности белка IND по сравнению с биологической активностью соответствующего белка IND дикого типа. Под значительным снижением или полным устранением биологической активности белка IND в данном документе понимают снижение или устранение активности связывания ДНК, способности к димеризации и/или активности белка IND, регулирующей транскрипцию, таким образом, устойчивость к раскалыванию стручка растения, экспрессирующего мутантный белок IND, повышается по сравнению с растением, экспрессирующим соответствующий белок IND дикого типа, сравнивая устойчивость к раскалыванию стручка растения соответствующего дикого типа.

В данном документе предлагаются как эндогенные, так и выделенные аминокислотные последовательности. Также предлагаются фрагменты аминокислотных последовательностей белка IND и вариативных аминокислотных последовательностей белка IND, определенных выше. "Фрагмент" аминокислотной последовательности белка IND или ее варианта (определенного) может иметь различную длину, такую как, по меньшей мере, 10, 12, 15, 18, 20, 50, 100, 150, 175, 180 последовательных аминокислот последовательности IND (или вариативной последовательности).

#### **Аминокислотные последовательности функциональных белков IND**

Аминокислотные последовательности, представленные в списке последовательностей, представляют собой функциональные белки IND дикого типа из растения *Brassica napus*. Таким образом, эти последовательности являются эндогенными для растений *Brassica napus*, из которых их выделяли. Другие сельскохозяйственные виды, сорта, линии бридинга или дикие предки могут быть скринированы в отношении других функциональных белков IND с теми же аминокислотными последовательностями или их вариантов, описанных выше.

Кроме того, понятно, что аминокислотные последовательности белка IND и их варианты (или фрагменты любой из них) могут быть идентифицированы с помощью компьютерного моделирования скринированием баз данных аминокислот в отношении по существу аналогичных последовательностей. Также предлагаются фрагменты молекул аминокислот по изобретению. Фрагменты включают аминокислотные последовательности домена bHLH или меньшие фрагменты, содержащие часть домена bHLH, такую как основной домен или домен HLH и т.д.

#### **Аминокислотные последовательности мутантных белков IND**

Аминокислотные последовательности, содержащие одну или несколько делеций, инсерций или замен аминокислот относительно аминокислотных последовательностей дикого типа представляют собой другой вариант осуществления изобретения, как и фрагменты таких мутантных молекул аминокислот. Такие мутантные аминокислотные последовательности могут быть созданы и/или идентифицированы, используя большое число известных способов, описанных выше. В свою очередь, такие молекулы аминокислот предлагаются как в эндогенной форме, так и в выделенной форме.

В одном из вариантов осуществления мутация (и) в аминокислотной последовательности приводит (ят) к значительно сниженной или полностью отсутствующей биологической активности белка IND относительно белка дикого типа. Как описано выше, в основном, любая мутация, которая приводит к белку, содержащему инсерцию, делецию и/или замену, по меньшей мере, одной аминокислоты относительно белка дикого типа, может приводить к значительно сниженной или отсутствующей биологической активности. Тем не менее, понятно, что мутации в некоторых частях белка более вероятно приведут к сниженной функции мутантного белка IND, такие как мутации, приводящие к усеченным белкам, вследствие чего значительные части функциональных доменов, таких как ДНК-связывающий домен ("b"), домен димеризации ("HLH") и/или аминокислоты, которые важны в регуляции транскрипции (см. табл. 1), теряются или замещаются.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления предлагаются мутантные белки IND, содержащие одну или несколько мутаций, делеций или инсерций, вследствие чего делеция(и) или инсерция (и) приводит(ят) к мутантному белку, который обладает значительно сниженной активностью или не имеет ее *in vivo*. Такие мутантные белки IND представляют собой белки IND, в которых, по меньшей мере, 1, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 150, 175, 180 или больше аминокислот удаляются или встраиваются по сравнению с белком IND дикого типа, вследствие чего делеция(и) или инсерция(и) приводит(ят) к мутантному белку, который обладает значительно сниженной активностью или не имеет ее *in vivo*.

В другом варианте осуществления предлагаются мутантные белки IND, которые являются усеченными, таким образом, усечение приводит к мутантному белку, который обладает значительно сниженной активностью или не имеет ее *in vivo*. Такие усеченные белки IND представляют собой белки IND, которые теряют функциональные домены в С-терминальной части соответствующего белка IND дикого типа и которые сохраняют N-терминальную часть соответствующего белка IND дикого типа. Таким образом, в одном из вариантов осуществления предлагается усеченный белок IND, содержащий N-терминальную

часть соответствующего белка IND дикого типа вплоть до, но не включая консервативного остатка Leu домена H2 (в положении 56 в консенсусной последовательности домена bHLH, описанной авторами Heim et al., 2003, см. выше). Мутантный белок является более усеченным по сравнению с белком дикого типа, большее усечение может приводить к значительно сниженной или отсутствующей активности белка IND. Таким образом, в другом варианте осуществления предлагается усеченный белок IND, содержащий N-терминальную часть соответствующего белка IND дикого типа, теряющий часть или весь второй домен H, и/или теряющий часть или весь домен L и/или теряющий часть или весь первый домен H и/или теряющий часть или весь основной домен (описанные выше), или даже больше аминокислот (см. табл. выше).

В еще одном варианте осуществления предлагаются мутантные белки IND, содержащие одну или несколько мутаций замен, вследствие чего замена(ы) приводит(ят) к мутантному белку, который обладает значительно сниженной активностью или не имеет ее *in vivo*. Такие мутантные белки IND представляют собой белки IND, у которых замещаются консервативные аминокислотные остатки, которые обладают специфической функцией, такой как функция связывания ДНК, димеризации или регуляции транскрипции. Таким образом, в одном из вариантов осуществления предлагается мутантный белок IND, содержащий замену консервативного аминокислотного остатка, который обладает биологической функцией, такого как консервативные аминокислоты основного домена или домена HI, L или H2, указанные в табл. 1 выше.

### Способы по изобретению

Мутантные аллели *ind* могут быть созданы (например, индуцированы мутагенезом) и/или идентифицированы, используя диапазон способов, принятых в данной области, например, используя способы на основе ПЦР для амплификации части или всего IND, геномного или из кДНК.

После мутагенеза растения выращивают из обработанных семян или регенерируют из обработанных клеток, используя известные техники. Например, подвергнутые мутагенезу семена могут быть выращены в соответствии с принятыми способами выращивания и после самоопыления на растениях образуются семена. Альтернативно, двойные гаплоидные проростки могут быть получены из клеток обработанных микроспор или пыльцы для непосредственного образования гомозиготных растений, например, как описано авторами Coventry et al. (1988, *Manual for Microspore Culture Technique for Brassica napus*. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489. Univ. of Guelph, Guelph, Ontario, Canada). Дополнительные семена, которые образуются в результате такого самоопыления в настоящем или последующем поколении, могут быть собраны и скринированы на наличие мутантных аллелей IND, используя техники, принятые в данной области, например, техники на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) (амплификация аллелей *ind*) или техники на основе гибридизации, например, анализ саузерн-блот, скрининг библиотеки ВАС и подобное и/или прямое секвенирование аллелей *ind*. Для скрининга на наличие точковых мутаций (так называемых однонуклеотидных полиморфизмов или SNP) в мутантных аллелях IND могут быть использованы способы детекции SNP, принятые в данной области, например, техники лигирования олигонуклеотидов, техники однонуклеотидного удлинения или техники на основе различий в сайтах рестрикции, такие как TILLING.

Описанная выше мутагенизация (спонтанная, а также индуцированная) специфического аллеля IND дикого типа приводит к наличию одного или нескольких удаленных, встроенных или замещенных нуклеотидов (далее в данном документе называемых "участок мутации") в полученном мутантном аллеле IND. Мутантный аллель IND может, таким образом, быть охарактеризован по локализации и конфигурации одного или нескольких удаленных, встроенных или замещенных нуклеотидов в аллеле IND дикого типа. Сайт в аллеле IND дикого типа, куда один или несколько нуклеотидов встроили, удалили или заменили, соответственно, в данном документе также обозначается как "участок или последовательность мутации". Термин "фланкирующий с 5'- или 3'-конца участок или последовательность", используемый в данном документе, относится к участку или последовательности ДНК в мутантном аллеле IND (или соответствующем аллеле дикого типа), по меньшей мере из 20 п.н., предпочтительно по меньшей мере 50 п.н., по меньшей мере 750 п.н., по меньшей мере 1500 п.н. и до 5000 п.н. последовательности ДНК, отличной от ДНК, содержащей один или несколько удаленных, встроенных или замещенных нуклеотидов, предпочтительно ДНК мутантного аллеля IND (или соответствующего аллеля дикого типа), которая расположена либо непосредственно выше и примыкая к ("фланкирующий с 5'-конца участок или последовательность") или непосредственно ниже и примыкая к ("фланкирующий с 3'-конца участок или последовательность") участку мутации в мутантном аллеле IND (или в соответствующем аллеле IND дикого типа). Термин "участок соединения", используемый в данном документе, относится к участку ДНК в мутантном аллеле IND (или соответствующем аллеле дикого типа), где участок мутации и фланкирующий с 5'- или 3'-конца участок связаны друг с другом. Последовательность, перекрывающая участок соединения между участком мутации и фланкирующим с 5'- или 3'-конца участком, таким образом, содержит последовательность мутации, а также фланкирующую последовательность, примыкающую к ней.

Средства, разработанные для идентификации специфического мутантного аллеля IND, или растения, или материала растения, содержащего специфический мутантный аллель IND, или продуктов, которые содержат растительный материал, содержащий специфический мутантный аллель IND, основаны на



специфических геномных характеристиках специфического мутантного аллеля IND в сравнении с геномными характеристиками соответствующего аллеля IND дикого типа, таких как карта специфической рестрикции геномного участка, содержащего участок мутации, молекулярные маркеры или последовательность фланкирующих участков и/или участка мутации.

После секвенирования специфического мутантного аллеля IND могут быть разработаны праймеры и зонды, которые специфически распознают последовательность в фланкирующем с 5'-конца, фланкирующем с 3'-конца участках и/или участке мутации мутантного аллеля IND в нуклеиновой кислоте (ДНК или РНК) образца с помощью молекулярно-биологической техники. Например, для идентификации мутантного аллеля IND в биологических образцах (таких как образцы растений, материала растений или продуктов, содержащих материал растений) может быть разработан способ ПЦР. Такая ПЦР основана, по меньшей мере, на двух специфических "праймерах": одном, распознающем последовательность в фланкирующем с 5'- или 3'-конца участке мутантного аллеля IND, и другом, распознающем последовательность в фланкирующем с 3'- или 5'-конца участке мутантного аллеля IND, соответственно; или одним, распознающем последовательность в фланкирующем с 5'- или 3'-конца участке мутантного аллеля IND, и другом, распознающем последовательность в участке мутации мутантного аллеля IND; или одним, распознающем последовательность в фланкирующем с 5'- или 3'-конца участке мутантного аллеля IND, и другом, распознающем последовательность, перекрывающую участок соединения между фланкирующим с 3'- или 5'-конца участком и участком мутации специфического мутантного аллеля IND (описанную дополнительно ниже), соответственно.

Праймеры предпочтительно имеют последовательность от 15 до 35 нуклеотидов, которая в оптимизированных условиях для проведения ПЦР "специфически распознает" последовательность в фланкирующем с 5'- или 3'-конца участке, последовательность в участке мутации или последовательность, перекрывающую участок соединения между фланкирующими с 3'- или 5'-конца участками и участком мутации специфического мутантного аллеля IND, так что специфический фрагмент ("специфический фрагмент мутантного IND" или дискриминирующий ампликон) амплифицируется из образца нуклеиновой кислоты, содержащей специфический мутантный аллель IND. Это способ, которым в оптимизированных условиях для проведения ПЦР амплифицируется лишь мишеный мутантный аллель IND и никакая другая последовательность в геноме растения.

ПЦР-праймеры, подходящие по изобретению, могут быть следующими:

олигонуклеотиды длиной от 17 до около 200 нуклеотидов, содержащие нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 17 последовательных нуклеотидов, предпочтительно 20 последовательных нуклеотидов, выбранную из фланкирующей с 5'-или 3'-конца последовательности специфического мутантного аллеля IND или ее комплемента (т.е., например, последовательность, фланкирующую с 5'- или 3'-конца один или несколько нуклеотидов, удаленных, встроенных или замещенных в мутантных аллелях IND по изобретению, такую как последовательность, фланкирующая с 5'- или 3'-конца нонсенс, миссенс-мутации или мутации со сдвигом рамки, описанные выше, или последовательность, фланкирующую с 5'- или 3'-конца мутации стоп-кодона, указанные в таблицах выше, или мутации замены, указанные выше, или ее комплемент) (праймеры, распознающие фланкирующие с 5'-конца последовательности); или

олигонуклеотиды длиной от 17 до около 200 нуклеотидов, содержащие нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 17 последовательных нуклеотидов, предпочтительно 20 нуклеотидов, выбранную из последовательности участка мутации специфического мутантного аллеля IND или ее комплемента (т.е., например, последовательность нуклеотидов, встроенную или замещенную в генах IND по изобретению, или ее комплемент) (праймеры, распознающие последовательности мутации).

Праймеры, конечно, могут быть длиннее, чем упомянутые 17 последовательных нуклеотидов, и могут иметь в длину, например, 18, 19, 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 нуклеотидов или даже быть длиннее. Праймеры могут состоять исключительно из нуклеотидной последовательности, выбранной из упомянутых нуклеотидных последовательностей фланкирующих последовательностей и последовательности мутации. Тем не менее, нуклеотидная последовательность праймеров на их 5'-конце (т.е. вне расположенных на 3'-конце 17 последовательных нуклеотидов) менее важна. Таким образом, 5'-последовательность праймеров может состоять из нуклеотидной последовательности, выбранной из фланкирующих последовательностей и последовательности мутации в соответствующих случаях, но может содержать несколько (например, 1, 2, 5, 10) нарушений комплементарности. 5'-последовательность праймеров может даже полностью состоять из нуклеотидной последовательности, не относящейся к фланкирующим последовательностям и последовательности мутации, такой как, например, нуклеотидная последовательность, представляющая сайты распознавания рестриктаз. Такие не относящиеся последовательности или фланкирующие ДНК последовательности с нарушениями комплементарности должны предпочтительно быть не длиннее чем 100, более предпочтительно не длиннее чем 50 или даже 25 нуклеотидов.

Более того, подходящие праймеры могут содержать или состоять из нуклеотидной последовательности, перекрывающей участок соединения между фланкирующими последовательностями и последовательностью мутации (т.е., например, участок соединения между последовательностью, фланкирующей с 5'- или 3'-конца один или несколько нуклеотидов, удаленных, встроенных или замещенных в мутантных аллелях IND по изобретению, и последовательностью одного или нескольких нуклеотидов, встроенных

или замещенных, или последовательностью, фланкирующей с 3'- или 5'-конца, соответственно, один или несколько удаленных нуклеотидов, такой как участок соединения между последовательностью, фланкирующей с 5'- или 3'-конца нонсенс, миссенс-мутации или мутации со сдвигом рамки в генах IND по изобретению, описанные выше, и последовательностью нонсенс, миссенс-мутаций или мутаций со сдвигом рамки, или участок соединения между последовательностью, фланкирующей с 5'- или 3'-конца мутацию потенциального стоп-кодона, указанную в таблицах выше, или мутации замены, указанные выше, и последовательностью мутации потенциального стоп-кодона или мутаций замены, соответственно), предложенная нуклеотидная последовательность не происходит полностью ни из участка мутации, ни из фланкирующих участков.

Также специалисту в данной области будет сразу понятно, что должным образом выбранные пары ПЦР-праймеров также не должны содержать последовательностей, комплементарных друг другу.

Для цели изобретения "комплемент нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID No: X" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая может быть получена из представленной нуклеотидной последовательности путем замены нуклеотидов на комплементарный им нуклеотид по правилам Чаргаффа ( $A \leftrightarrow T$ ;  $G \leftrightarrow C$ ) и прочтения последовательности в направлении от 5' к 3', т.е. в направлении, обратном представленной нуклеотидной последовательности.

Примеры праймеров, подходящих для идентификации специфических мутантных аллелей IND, описываются в примерах.

Используемый в данном документе термин "нуклеотидная последовательность SEQ ID No. Z от положения X до положения Y" указывает на нуклеотидную последовательность, включающую обе конечные точки нуклеотидов.

Предпочтительно, чтобы амплифицируемый фрагмент имел длину от 50 до 1000 нуклеотидов, такую как длину от 50 до 500 нуклеотидов или длину от 100 до 350 нуклеотидов. Специфические праймеры могут иметь последовательность, которая на от 80 до 100% идентична последовательности в фланкирующем с 5'- или 3'-конца участке, последовательности в участке мутации или последовательности, перекрывающей участок соединения между фланкирующим с 3'- или 5'-конца участком и участком мутации специфического мутантного аллеля IND, предложенные нарушения комплементарности еще дают возможность специфической идентификации специфического мутантного аллеля IND с помощью этих праймеров в условиях, оптимизированных для проведения ПЦР. Диапазон допустимых нарушений комплементарности, тем не менее, может быть без труда определен экспериментально, и они известны специалисту в данной области.

Детекция и/или идентификация "специфического фрагмента мутантного IND" может происходить большим числом способов, например, через оценку размера после проведения гель- или капиллярного электрофореза или путем способов детекции на основе флуоресценции. Специфические фрагменты мутантного IND также могут быть прямо секвенированы. В данной области также известны и другие сайт-специфические способы детекции амплифицированных ДНК-фрагментов.

В данной области описываются стандартные протоколы проведения ПЦР, такие как описанные в руководстве "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2nd Edition, 1999) и других ссылках. Оптимальные условия для проведения ПЦР, включая последовательность специфических праймеров, определены в "протоколе идентификации с помощью ПЦР" для каждого специфического мутантного аллеля IND. Тем не менее, понятно, что может потребоваться довести количество параметров в протоколе идентификации с помощью ПЦР до конкретных условий лаборатории, и оно может быть несколько модифицировано для получения схожих результатов. Например, применение отличного способа получения ДНК может потребовать доведения, например, используемого количества праймеров, полимеразы, концентрации  $MgCl_2$  или условий отжига. Аналогично, выбор других праймеров может потребовать других оптимальных условий для протокола идентификации с помощью ПЦР. Эти доведения, тем не менее, будут очевидны для специалиста в данной области и более подробно изложены в существующих руководствах по применению ПЦР, таких как руководство, приводимое выше.

Примеры протоколов идентификации с помощью ПЦР для идентификации специфических мутантных аллелей IND описываются в примерах.

Альтернативно, специфические праймеры могут быть использованы для амплификации специфического фрагмента мутантного IND, который может быть использован в качестве "специфического зонда" для идентификации специфического мутантного аллеля IND в биологических образцах. Приведение в контакт нуклеиновой кислоты биологического образца с зондом в условиях, которые позволяют гибридизацию зонда с соответствующим ему фрагментом в нуклеиновой кислоте, приводит к образованию гибрида нуклеиновая кислота/зонд. Образование этого гибрида может быть детектировано (например, мечением нуклеиновой кислоты или зонда), тем самым образование этого гибрида указывает на наличие специфического мутантного аллеля IND. Такие способы идентификации, основанные на гибридизации со специфическим зондом (либо на твердофазном носителе, либо в растворе), были описаны в данной области. Специфический зонд представляет собой предпочтительно последовательность, которая в оптимизированных условиях гибридизуется специфически с участком во фланкирующем с 5'- или 3'-конца участке и/или в участке мутации специфического мутантного аллеля IND (далее в данном документе обо-

значаемым как "специфический участок мутантного IND"). Предпочтительно, чтобы специфический зонд содержал последовательность от 10 до 1000 п.н., от 50 до 600 п.н., от 100 до 500 п.н., от 150 до 350 п.н., которая, по меньшей мере, на 80%, предпочтительно от 80 до 85%, более предпочтительно от 85 до 90%, особенно предпочтительно от 90 до 95%, самое предпочтительное от 95 до 100% гомологична (или комплементарна) нуклеотидной последовательности специфического участка. Предпочтительно, чтобы специфический зонд содержал последовательность от около 13 до около 100 последовательных нуклеотидов, гомологичную (или комплементарную) специфическому участку специфического мутантного аллеля IND.

Специфические зонды, подходящие по изобретению, могут быть следующими:

олигонуклеотиды длиной от 13 до около 1000 нуклеотидов, содержащие нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, из 13 последовательных нуклеотидов, выбранную из фланкирующей с 5'-или 3'-конца последовательности специфического мутантного аллеля IND или ее комплемента (т.е., например, последовательность, фланкирующую с 5'-или 3'-конца один или несколько нуклеотидов, удаленных, встроенных или замещенных, в мутантных аллелях IND по изобретению, такую как последовательность, фланкирующую с 5'-или 3'-конца нонсенс, миссенс-мутации или мутации со сдвигом рамки, описанные выше, или последовательность, фланкирующую с 5'-или 3'-конца мутации потенциального стоп-кодона, указанные в таблицах выше, или мутации замены, указанные выше), или последовательность, имеющую с ней, по меньшей мере, 80% гомологии последовательности (зонды, распознающие фланкирующие с 5'-конца последовательности); или

олигонуклеотиды длиной от 13 до около 1000 нуклеотидов, содержащие нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, из 13 последовательных нуклеотидов, выбранную из последовательности мутации специфического мутантного аллеля IND или ее комплемента (т.е., например, последовательность нуклеотидов, встроенных или замещенных в генах IND по изобретению, или ее комплемент) или последовательность, имеющую с ней, по меньшей мере, 80% гомологии последовательности (зонды, распознающие последовательности мутации).

Зонды могут состоять исключительно из нуклеотидной последовательности, выбранной из упомянутых нуклеотидных последовательностей фланкирующих последовательностей и последовательности мутации. Тем не менее, нуклеотидная последовательность зондов на их 5'-или 3'-концах менее важна. Таким образом, 5'-или 3'-последовательности зондов могут состоять из нуклеотидной последовательности, выбранной из фланкирующих последовательностей или последовательности мутации в соответствующих случаях, но могут состоять из нуклеотидной последовательности, не относящейся к фланкирующим последовательностям или последовательности мутации. Такие не относящиеся последовательности предпочтительно должны быть не длиннее чем 50, более предпочтительно не длиннее чем 25 или даже не длиннее чем 20 или 15 нуклеотидов.

Более того, подходящие зонды могут содержать или состоять из нуклеотидной последовательности, перекрывающей участок соединения между фланкирующими последовательностями и последовательностью мутации (т.е., например, участок соединения между последовательностью, фланкирующей с 5'-или 3'-конца один или несколько нуклеотидов, удаленных, встроенных или замещенных в мутантных аллелях IND по изобретению, и последовательностью одного или нескольких нуклеотидов, встроенных или замещенных, или последовательностью фланкирующей с 3'-или 5'-конца, соответственно, один или несколько удаленных нуклеотидов, такой как участок соединения между последовательностью, фланкирующей с 5'-или 3'-конца нонсенс, миссенс-мутации или мутации со сдвигом рамки в генах IND по изобретению, описанные выше, и последовательностью нонсенс, миссенс-мутаций или мутаций со сдвигом рамки, или участок соединения между последовательностью, фланкирующей с 5'-или 3'-конца мутацию потенциального стоп-кодона, указанную в таблицах выше, или мутации замены, указанные выше, и последовательностью мутации потенциального стоп-кодона или мутации замены, соответственно), предложенная упомянутая нуклеотидная последовательность не происходит полностью ни из участка мутации, ни из фланкирующих участков.

Примеры специфических зондов, подходящих для идентификации специфических мутантных аллелей IND, описываются в примерах.

Детекция и/или идентификация "специфического участка мутантного IND", гибридизующегося со специфическим зондом может происходить большим числом способов, например, путем оценки размера после проведения гель-электрофореза или путем способов детекции на основе флуоресценции. В данной области также известны другие сайт-специфические способы детекции "специфического участка мутантного IND", гибридизующегося со специфическим зондом.

Альтернативно, растения или части растения, содержащие один или несколько мутантных аллелей ind, могут быть получены и идентифицированы, используя другие способы, такие как способ "Delete-a-gene™", в котором используется ПЦР для скрининга в отношении мутаций делеций, полученных посредством мутагенеза быстрыми нейтронами (описан авторами Li и Zhang, 2002, *Funct Integr Genomics* 2:254-258), посредством способа TILLING (введение индуцированных локальных повреждений в геномах), с помощью которого идентифицируют EMS-индуцированные точечные мутации, используя денатурирующую высокоэффективную жидкостную хроматографию (DHPLC) для детекции изменений пар нук-

леотидов с помощью гетеродуплексного анализа (McCallum et al., 2000, Nat Biotech 18:455, and McCallum et al. 2000, Plant Physiol. 123, 439-442) и т.д. В упомянутом способе TILLING используется высокопроизводительный скрининг мутаций (например, используя расщепление Cel I гетеродуплексов мутантной-дикого типа ДНК и определение, используя систему секвенирующего геля). Таким образом, данным документом охватывается применение TILLING для идентификации растений или частей растений, содержащих один или несколько мутантных аллелей ind, и способы создания и идентификации таких растений, органов растений, тканей и семян. Таким образом, в одном из вариантов осуществления способ по изобретению содержит стадии мутагенизации растительных семян (например, мутагенез с помощью EMS), депонирования отдельных растений или ДНК, ПЦР-амплификации интересующего участка, образования гетеродуплекса и высокопродуктивной детекции, идентификации мутантного растения, секвенирования мутантного ПЦР-продукта. Понятно, что для создания таких мутантных растений могут в равной степени использоваться и другие способы мутагенеза и отбора.

Вместо индуцирования мутаций в аллелях IND, природные (спонтанные) мутантные аллели могут быть идентифицированы способами, известными в данной области. Например, для скрининга большого числа растений или частей растений на наличие природных мутантных аллелей ind может быть использован способ ECOTILLING (Henikoff et al. 2004, Plant Physiology 135(2): 630-6). В отношении техник мутагенеза выше, предпочтительно скринируют виды Brassica, которые содержат геном А и/или С, так что идентифицированный аллель ind может затем быть встроен в другие виды рода Brassica, такие как Brassica napus, посредством скрещивания (меж- или внутривидовые скрещивания) и селекции. В способе ECOTILLING природные полиморфизмы в линиях скрещивания или родственных видах скринируют посредством методологии TILLING, описанной выше, в которой для ПЦР-амплификации мишени IND, образования гетеродуплекса и высокопроизводительного анализа используют отдельные растения или пулы растений. Это можно осуществить с последующим отбором отдельных растений, имеющих требуемую мутацию, которые затем могут быть использованы в программе скрещивания для встраивания желаемого мутантного аллеля.

Идентифицированные мутантные аллели затем могут быть секвенированы, и последовательность может быть сравнена с аллелем дикого типа для идентификации мутации(й).

Необязательно, функциональность может быть протестирована, как указано выше. Используя такой подход, может быть идентифицировано большое число мутантных аллелей ind (и растений Brassica, содержащих один или несколько из них). Желаемые мутантные аллели затем могут быть скомбинированы с желаемыми аллелями дикого типа с помощью способов скрещивания и отбора, описанных дополнительно ниже. В результате создают единственное растение, содержащее желаемое количество мутантных аллелей ind и желаемое количество аллелей IND дикого типа.

Олигонуклеотиды, подходящие в качестве праймеров для проведения ПЦР или специфических зондов для детекции специфического мутантного аллеля IND, также могут использоваться для разработки способов определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND.

Для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND может быть разработан анализ ПЦР на определение наличия мутантного специфического аллеля IND и/или соответствующего специфического аллеля IND дикого типа.

Для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND могут быть созданы два праймера, специфически распознающие аллель IND дикого типа, таким образом, что они направлены друг на друга и имеют участок мутации, расположенный между праймерами. Эти праймеры могут представлять собой праймеры, специфически распознающие фланкирующие с 5'- и 3'-конца последовательности, соответственно. Этот набор праймеров позволяет одновременно диагностическую ПЦР-амплификацию мутантного, а также соответствующего аллеля IND дикого типа.

Альтернативно, для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND могут быть созданы два праймера, специфически распознающие аллель IND дикого типа, таким образом, что они направлены друг на друга и что один из них специфически распознает участок мутации. Эти праймеры могут представлять собой праймеры, специфически распознающие последовательность фланкирующего с 5'- и 3'-конца участка и участка мутации аллеля IND дикого типа, соответственно. Этот набор праймеров вместе с третьим праймером, который специфически распознает последовательность участка мутации в мутантном аллеле IND, позволяет одновременно диагностическую ПЦР-амплификацию мутантного гена IND, а также гена IND дикого типа.

Альтернативно, для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND могут быть созданы два праймера, специфически распознающие аллель IND дикого типа, таким образом, что они направлены друг на друга и что один из них специфически распознает участок соединения между 5' или 3' фланкирующим участком и участком мутации. Эти праймеры могут представлять собой праймеры, специфически распознающие фланкирующую с 5'- или 3'-конца последовательность и участок соединения между участком мутации и фланкирующим с 3'- или 5'-конца участком аллеля IND дикого типа, соответственно. Этот набор праймеров вместе с третьим праймером, который специфически распознает участок соединения между участком мутации и фланкирующим с 3'- или 5'-конца участком мутантного аллеля IND, соответственно, позволяет одновременно диагностическую ПЦР-амплификацию

мутантного гена IND, а также гена IND дикого типа.

Альтернативно, статус зиготности специфического мутантного аллеля IND может быть определен, используя альтернативные наборы праймеров, которые специфически распознают мутантные аллели IND и аллель IND дикого типа.

Если растение гомозиготно по мутантному гену IND или соответствующему гену IND дикого типа, то диагностические ПЦР-исследования, описанные выше, будут приводить к единственному ПЦР-продукту, характерному, предпочтительно характерному по длине, либо для мутантного аллеля IND, либо для аллеля IND дикого типа. Если растение гетерозиготно по мутантному аллелю IND, то будет появляться два специфических ПЦР-продукта, отражающих амплификацию как мутантного аллеля IND, так и аллеля IND дикого типа.

Идентификацию специфических ПЦР-продуктов IND дикого типа и мутантного IND можно осуществить, например, с помощью оценки размера после проведения гель- или капиллярного электрофореза (например, для мутантных аллелей IND, содержащих большое число встроенных или удаленных нуклеотидов, что приводит к различию размера между фрагментами, амплифицированными с аллеля IND дикого типа и мутантного аллеля IND, так что указанные фрагменты могут быть визуально различимы на геле); с помощью оценки наличия или отсутствия двух различных фрагментов после проведения гель- или капиллярного электрофореза, тем самым диагностическая ПЦР-амплификация мутантного аллеля IND, необязательно, может быть осуществлена отдельно от диагностической ПЦР-амплификации аллеля IND дикого типа; с помощью прямого секвенирования амплифицированных фрагментов; или с помощью способов флуоресцентной детекции.

Примеры праймеров, подходящих для определения зиготности специфических мутантных аллелей IND, описываются в примерах.

Альтернативно, для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND может быть разработано гибридизационное исследование на определение наличия мутантного специфического аллеля IND и/или соответствующего специфического аллеля IND дикого типа.

Для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND могут быть созданы два специфических зонда, распознающих аллель IND дикого типа, таким образом, что каждый зонд специфически распознает последовательность в аллеле IND дикого типа и что участок мутации расположен между последовательностями, распознаваемыми зондами. Эти зонды могут представлять собой зонды, специфически распознающие 5' и 3' фланкирующие последовательности, соответственно. Применение одного или предпочтительно обоих этих зондов позволяет одновременно диагностическую гибридизацию мутантного, а также соответствующего аллеля IND дикого типа.

Альтернативно, для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND могут быть созданы два специфических зонда, распознающие аллель IND дикого типа, таким образом, что один из них специфически распознает последовательность в аллеле IND дикого типа выше или ниже участка мутации, предпочтительно выше участка мутации, и что один из них специфически распознает участок мутации. Эти зонды могут представлять собой зонды, специфически распознающие последовательность фланкирующего с 5'- или 3'-конца участка, предпочтительно фланкирующего с 5'-конца участка, и участка мутации аллеля IND дикого типа, соответственно. Применение одного или предпочтительно обоих этих зондов необязательно вместе с третьим зондом, который специфически распознает последовательность участка мутации в мутантном аллеле IND, позволяет диагностическую гибридизацию мутантного гена IND и гена IND дикого типа.

Альтернативно, для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND может быть создан специфический зонд, распознающий аллель IND дикого типа, таким образом, что зонд специфически распознает участок соединения между фланкирующим с 5'- или 3'-конца участком, предпочтительно фланкирующим с 5'-конца участком, и участком мутации аллеля IND дикого типа. Этот зонд необязательно вместе со вторым зондом, который специфически распознает участок соединения между фланкирующим с 5'- или 3'-конца участком, предпочтительно фланкирующим с 5'-конца участком, и участком мутации мутантного аллеля IND, позволяет диагностическую гибридизацию мутантного гена IND и гена IND дикого типа.

Альтернативно, статус зиготности специфического мутантного аллеля IND может быть определен, используя альтернативные наборы зондов, которые специфически распознают мутантные аллели IND и аллель IND дикого типа.

Если растение гомозиготно по мутантному гену IND или соответствующему гену IND дикого типа, то диагностические гибридизационные исследования, описанные выше, будут приводить к единственному специфическому продукту гибридизации, такому как один или несколько фрагментов (рестрикции) гибридизовавшейся ДНК, характерных, предпочтительно характерных по длине, либо для мутантного аллеля IND, либо для аллеля IND дикого типа. Если растение гетерозиготно по мутантному аллелю IND, то появится два специфических продукта гибридизации, отражающих гибридизацию как мутантного аллеля IND, так и аллеля IND дикого типа.

Идентификацию специфических продуктов гибридизации IND дикого типа и мутантного IND можно осуществлять, например, с помощью оценки размера после проведения гель- или капиллярного элек-

трофореза (например, для мутантных аллелей IND, содержащих большое число встроенных или удаленных нуклеотидов, что приводит к различию размера между фрагментами (рестрикции) гибридизовавшейся ДНК, полученными из аллеля IND дикого типа и мутантного аллеля IND, так что указанные фрагменты могут быть визуально различимы на геле); с помощью оценки наличия или отсутствия двух различных специфических продуктов гибридизации после проведения гель- или капиллярного электрофореза, вследствие чего диагностическая гибридизация мутантного аллеля IND необязательно может быть осуществлена отдельно от диагностической гибридизации аллеля IND дикого типа; с помощью прямого секвенирования фрагментов (рестрикции) гибридизовавшейся ДНК; или с помощью способов флуоресцентной детекции.

Примеры зондов, подходящих для определения зиготности специфических мутантных аллелей IND, описываются в примерах.

Более того, также могут быть разработаны способы детекции, специфичные для специфического мутантного аллеля IND, которые отличаются от способов амплификации, основанных на ПЦР или гибридизации, используя предлагаемую в данном документе информацию о специфической последовательности специфического мутантного аллеля IND. К таким альтернативным способам детекции относятся способы детекции линейной амплификации сигнала, основанные на инвазивном расщеплении определенных структур нуклеиновых кислот, также известном как технология Invader™ (описанная, например, в патенте США 5985557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", патенте 6001567 "Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage", приведенных в данном документе в качестве ссылки), способы детекции на основе ОТ-ПЦР, такие как Taqman, или другие способы детекции, такие как SNPlex. Вкратце, в технологии Invader™ последовательность мишенной мутации может быть, например, гибридизована с меченым первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность последовательности мутации или последовательность, перекрывающую участок соединения между 5'-фланкирующим участком и участком мутации, и со вторым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим фланкирующую с 3'-конца последовательность непосредственно ниже и прилегающую к последовательности мутации, где первый и второй олигонуклеотиды перекрываются, по меньшей мере, одним нуклеотидом. Дуплексная или триплексная структура, которая создается этой гибридизацией, дает возможность селективного расщепления зонда ферментом (Cleavase®), оставляющим мишенную последовательность интактной. Расщепленный меченый зонд затем детектируют, возможно, через промежуточную стадию, приводящую к дополнительному умножению сигнала.

Термин "набор", используемый в данном документе, относится к набору реагентов для цели осуществления способа по изобретению, конкретнее, идентификации специфического мутантного аллеля IND в биологических образцах или определения статуса зиготности растительного материала, содержащего специфический мутантный аллель IND. Конкретнее, предпочтительный вариант осуществления набора по изобретению содержит, по меньшей мере, два специфических праймера, описанных выше, для идентификации специфического мутантного аллеля IND или по меньшей мере два или три специфических праймера для определения статуса зиготности. Необязательно, набор может дополнительно содержать любой другой реагент, описанный в данном документе в протоколе идентификации с помощью ПЦР. Альтернативно, по другому варианту осуществления данного изобретения набор может содержать, по меньшей мере, один специфический зонд, который специфически гибридизуется с нуклеиновой кислотой биологических образцов для определения наличия в них специфического мутантного аллеля IND, как описано выше, для идентификации специфического мутантного аллеля IND, или по меньшей мере два или три специфических зонда для определения статуса зиготности. Необязательно, набор может дополнительно содержать любой другой реагент (такой как, но им не ограничиваясь, гибридизационный буфер, метку) для идентификации специфического мутантного аллеля IND в биологических образцах, используя специфический зонд.

Набор по изобретению может быть использован и его компоненты могут быть специфически доведены с целью контроля качества (например, чистоты партий семян), определения наличия или отсутствия специфического мутантного аллеля IND в растительном материале или материале, содержащем или полученном из растительного материала, таком как, но им не ограничиваясь, продукты питания или кормления.

Термин "праймер", используемый в данном документе, охватывает любую нуклеиновую кислоту, которая способна инициировать синтез возникающей нуклеиновой кислоты в матрично-зависимом процессе, таком как ПЦР. Как правило, праймеры представляют собой олигонуклеотиды от 10 до 30 нуклеотидов, но могут использоваться и более длинные последовательности. Праймеры могут предлагаться в двухцепочечной форме, хотя предпочтительна одноцепочечная форма. Зонды могут быть использованы в качестве праймеров, но создаются для связывания с мишенной ДНК или РНК и нет необходимости использовать их в процессе амплификации.

Под термином "распознающий", используемым в данном документе в отношении специфических праймеров, понимают тот факт, что специфические праймеры специфически гибридизуются с последовательностью нуклеиновой кислоты в специфическом мутантном аллеле IND в условиях, приведенных в

данном способе (таких как условия протокола идентификации посредством ПЦР), тем самым специфичность определяется наличием положительного и отрицательного контролей.

Под термином "гибридирующий", используемым в данном документе в отношении специфических зондов, понимают тот факт, что зонд связывается со специфическим участком в последовательности нуклеиновой кислоты специфического мутантного аллеля IND в условиях стандартной жесткости. Под условиями стандартной жесткости, используемыми в данном документе, понимают условия гибридизации, описанные в данном документе, или принятые условия гибридизации, описанные авторами Sambrook et al., 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY), которые, например, могут содержать следующие стадии: 1) иммобилизацию фрагментов геномной ДНК растения или библиотеки ДНК ВАС на фильтре, 2) предгибридизацию фильтра в течение от 1 до 2 часов при 65°C в 6-кратном SSC, 5-кратном реагенте Денхардта, 0,5% SDS и 20 мкг/мл денатурированной ДНК-носителя, 3) добавление меченого гибридизационного зонда, 4) инкубацию в течение от 16 до 24 часов, 5) отмывку фильтра один раз в течение 30 мин при 68°C в 6-кратном SSC, 0,1% SDS, 6) отмывку фильтра три раза (два раза в течение 30 мин. в 30 мл и один раз в течение 10 мин. в 500 мл) при 68°C в 2-кратном SSC, 0,1% SDS, и 7) экспозицию фильтра в течение от 4 до 48 ч с рентгеновской пленкой при -70°C.

Под используемым в данном документе термином "биологический образец" понимают образец растения, растительного материала или продукта, содержащего растительный материал. Под термином "растение" понимают ткани растения на любой стадии созревания, а также любые клетки, ткани или органы, полученные или происходящие из любого такого растения, включая без ограничения любые семена, листья, стебли, цветки, корни, единичные клетки, гаметы, клеточные культуры, тканевые культуры или протопласты. Под "растительным материалом", используемым в данном документе, понимают материал, который получен или происходит из растения. Под продуктами, содержащими растительный материал, понимают продукты питания, кормления или другие продукты, которые получены, используя растительный материал, или могут быть загрязнены растительным материалом. Понятно, что в контексте настоящего изобретения такие биологические образцы тестируют на наличие нуклеиновых кислот, специфичных для специфического мутантного аллеля IND, предполагая наличие нуклеиновых кислот в образцах. Таким образом, относящиеся к данному документу способы идентификации специфического мутантного аллеля IND в биологических образцах, относятся к идентификации в биологических образцах нуклеиновых кислот, которые содержат специфический мутантный аллель IND.

Настоящее изобретение также относится к комбинации специфических аллелей IND в одном растении, переносу одного или нескольких специфического(их) мутантного(ых) аллеля (ей) IND из одного растения в другое растение, растениям, содержащим один или несколько специфический(их) мутантный(ых) аллель(ей) IND, потомству, полученному от этих растений, и клеткам растения, частям растения и семенам растения, полученным из этих растений.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения предлагается способ комбинирования двух или больше выбранных мутантных аллелей IND в одном растении, содержащий следующие стадии:

(a) создание и/или идентификацию двух или больше растений, содержащих один или несколько выбранных мутантных аллелей IND, как описано выше,

(b) скрещивание первого растения, содержащего один или несколько выбранных мутантных аллелей IND, со вторым растением, содержащим один или несколько других выбранных мутантных аллелей IND, сбор семян F1 от скрещивания и, необязательно, идентификацию растения F1, содержащего один или несколько выбранных мутантных аллелей IND от первого растения с одним или несколькими выбранными мутантными аллелями IND от второго растения, как описано выше,

(c) необязательно, повтор стадии (b) до тех пор пока не получится растение F1, содержащее все выбранные мутантные аллели IND,

(d) необязательно,

идентификацию растения F1, которое гомозиготно или гетерозиготно по выбранному мутантному аллелю IND, посредством определения статуса зиготности мутантных аллелей IND, как описано выше, или

создание растений, которые гомозиготны по одному или нескольким выбранным мутантным аллелям IND, путем осуществления одной из следующих стадий:

выделение двойных гаплоидных растений из клеток обработанных микроспор или пыльцы растений F1, содержащих один или несколько выбранных мутантных аллелей IND, как описано выше,

самоопыление растений F1, содержащих один или несколько выбранный(ых) мутантный(ых) аллель(ей) IND, в одном или нескольких поколениях (y), сбор семян Sy F1 от самоопылений и идентификацию растений Sy F1, которые гомозиготны по одному или нескольким мутантным аллелям IND, как описано выше.

В другом варианте осуществления изобретения предлагается способ переноса одного или нескольких мутантных аллелей IND из одного растения в другое растение, содержащий следующие стадии:

(a) создание и/или идентификацию первого растения, содержащего один или несколько выбранных



мутантных аллелей IND, как описано выше, или создание первого растения комбинированием одного или нескольких выбранных мутантных аллелей IND в одном растении, как описано выше (где первое растение гомозиготно или гетерозиготно по одному или нескольким мутантным аллелям IND),

(b) скрещивание первого растения, содержащего один или несколько мутантных аллелей IND со вторым растением, не содержащим одного или нескольких мутантных аллелей IND, сбор семян F1, полученных от скрещивания (где семена гетерозиготны по мутантному аллелю IND, если первое растение было гомозиготным по этому мутантному аллелю IND, и где половина семян гетерозиготна и половина семян азиатна, т.е. не содержит мутантного аллеля IND, если первое растение было гетерозиготно по данному мутантному аллелю IND) и, необязательно, идентификацию растений F1, содержащих один или несколько выбранных мутантных аллелей IND, как описано выше,

(c) возвратное скрещивание растений F1, содержащих один или несколько выбранных мутантных аллелей IND, со вторым растением, не содержащим одного или нескольких выбранных мутантных аллелей IND, в одном или нескольких поколениях (x), сбор семян BCx от скрещиваний и идентификацию в каждом поколении растений BCx, содержащих один или несколько выбранных мутантных аллелей IND, как описано выше,

(d) необязательно, создание растений BCx, которые гомозиготны по одному или нескольким выбранным мутантным аллелям IND, путем осуществления следующих стадий:

выделения двойных гаплоидных растений из клеток обработанных микроспор или пыльцы растений BCx, содержащих один или несколько желаемый(ых) мутантный(ых) аллель(ей) IND, как описано выше,

самоопыления растений BCx, содержащих один или несколько желаемый(ых) мутантный(ых) аллель(ей) IND, в одном или нескольких поколениях (y), сбора семян Sy BCx от самоопылений и идентификации растений Sy BCx, которые гомозиготны по одному или нескольким желаемым мутантным аллелям IND, как описано выше.

В одном из аспектов изобретения первое и второе растение представляют собой растения из семейства Brassicaceae, в частности растения рода Brassica, особенно растения вида Brassica napus или растения других сельскохозяйственных видов рода Brassica. В другом аспекте изобретения первое растение представляет собой растение семейства Brassicaceae, в частности растение рода Brassica, особенно растение Brassica napus или растение другого сельскохозяйственного вида рода Brassica, и второе растение представляет собой растение из линии бридинга семейства Brassicaceae, в частности из линии бридинга Brassica, особенно из линии бридинга Brassica napus или из линии бридинга другого сельскохозяйственного вида рода Brassica. "Линия бридинга", используемая в данном документе, представляет собой предпочтительно линию гомозиготных растений, отличающуюся от других линий растений предпочтительным генотипом и/или фенотипом, который используется для продукции гибридного потомства.

В еще одном варианте осуществления изобретения предлагается способ создания растения, в частности сельскохозяйственного растения рода Brassica, такого как растение Brassica napus, у которого повышена устойчивость к раскалыванию стручка, но которое предпочтительно сохраняет агрономически подходящую обмолочиваемость стручков, содержащий комбинирование и/или перенос мутантных аллелей IND по изобретению в одно растение рода Brassica, как описано выше.

В одном из аспектов изобретения растение представляет собой растение рода Brassica, содержащее по меньшей мере два гена IND, у которого повышена устойчивость к раскалыванию стручка, в то же время сохраняя агрономически подходящую обмолочиваемость стручков, посредством комбинирования и/или переноса трех мутантных аллелей IND по изобретению в растение рода Brassica, как описано выше.

В еще одном варианте осуществления изобретения предлагается способ создания гибридного семени или растения сельскохозяйственной культуры рода Brassica, содержащего, по меньшей мере, два гена IND genes, в частности гибридных семян или растения Brassica napus, у которого повышена устойчивость к раскрытию стручка, но которое сохраняет агрономически подходящую обмолочиваемость стручков, содержащий следующие стадии:

(a) создание и/или идентификацию первого растения, содержащего первый и второй выбранный мутантный аллель IND в гомозиготном состоянии, и второго растения, содержащего третий выбранный мутантный аллель IND в гомозиготном состоянии, как описано выше,

(b) скрещивание первого и второго растения и сбор гибридных семян F1 от скрещивания.

В одном из аспектов изобретения первый или второй выбранный мутантный аллель IND представляет собой тот же мутантный аллель IND, что и третий выбранный мутантный аллель IND, так что гибридные семена F1 гомозиготны по одному мутантному аллелю IND и гетерозиготны по другому. В другом аспекте изобретения первое растение используют в качестве мужского родительского растения и второе растение используют в качестве женского родительского растения. В одном из вариантов осуществления первое растение полностью устойчиво к раскрытию стручков. Такие растения могут быть получены засевом абсолютно нераскрывшихся семенных стручков, полученных самоопылением растений, и сбором целых семенных стручков вместо обмолота семенных стручков для сбора семян.



## Последовательности

### Гены *IND*

SEQ ID NO: 1: Кодированная ДНК гена *IND-A1*, кодирующего белок IND-A1 дикого типа растения *Brassica napus*.

SEQ ID NO: 2: белок IND-A1 дикого типа, кодируемый последовательностью SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3: Кодированная ДНК гена *IND-C1*, кодирующего белок IND-C1 дикого типа растения *Brassica napus*.

SEQ ID NO: 4: белок IND-C1 дикого типа, кодируемый SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 5: Геномная ДНК гена *IND-A1*, кодирующего белок IND-A1 дикого типа растения *Brassica napus*.

SEQ ID NO: 6: белок IND-A1 дикого типа, кодируемый SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 7: Геномная ДНК гена *IND-C1*, кодирующего белок IND-C1 дикого типа растения *Brassica napus*.

SEQ ID NO: 8: белок IND-C1 дикого типа, кодируемый SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 9: Кодированная ДНК гена *IND1* растения *Arabidopsis*.

SEQ ID NO: 10: белок IND1 растения *Arabidopsis*, кодируемый последовательностью SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NO: 11: нуклеотидная последовательность гомолога *IND* растения *Brassica napus* (BN1-*IND* - SEQ ID NO: 2 WO 04/113542)

SEQ ID NO: 12: нуклеотидная последовательность второго гомолога *IND* растения *Brassica napus* (BN2-*IND* - SEQ ID NO: 3 WO 04/113542)

### Праймеры и зонды

SEQ ID NO 13: Прямой олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS01

SEQ ID NO 14: Прямой олигонуклеотид для детекции IND-A1-WT

SEQ ID NO 15: Обратный олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS01 и -WT

SEQ ID NO 16: Прямой олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS05

SEQ ID NO 17: Прямой олигонуклеотид для детекции IND-A1-WT

SEQ ID NO 18: Обратный олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS05 и -WT

SEQ ID NO 19: Обратный олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS01

SEQ ID NO 20: Обратный олигонуклеотид для детекции IND-C1-WT

SEQ ID NO 21: Прямой олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS01 и -WT

SEQ ID NO 22: Обратный олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS03

SEQ ID NO 23: Обратный олигонуклеотид для детекции IND-C1-WT

SEQ ID NO 24: Прямой олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS03 и -WT

SEQ ID NO 25: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS01 и -WT

SEQ ID NO 26: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS01

SEQ ID NO 27: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-WT

SEQ ID NO 28: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS05 и -WT

SEQ ID NO 29: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS05

SEQ ID NO 30: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-WT

SEQ ID NO 31: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS01 и -WT

SEQ ID NO 32: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS01

SEQ ID NO 33: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-WT  
 SEQ ID NO 34: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS03 и -  
 WT  
 SEQ ID NO 35: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS03  
 SEQ ID NO 36: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-WT  
 SEQ ID NO 37: Прямой олигонуклеотид для детекции IND-A1  
 SEQ ID NO 38: Обратный олигонуклеотид для детекции IND-A1  
 SEQ ID NO 39: Прямой олигонуклеотид для детекции IND-C1  
 SEQ ID NO 40: Обратный олигонуклеотид для детекции IND-C1

Если в примерах не оговорено иначе, все техники рекомбинантных ДНК осуществляют в соответствии со стандартными молекулярно-биологическими техниками, описанными в руководстве Sambrook и Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, в 1 и 2 томах Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA и томах I и II Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, Second Edition, Academic Press (UK). Стандартные материалы и способы молекулярных исследований на растениях описываются в руководстве *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) автором R.D.D. Croy, опубликованным совместно BIOS Scientific Publications Ltd (UK) и Blackwell Scientific Publications, UK. Стандартные материалы и способы полимеразных цепных реакций можно найти в руководстве Dieffenbach и Dveksler (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press и в руководстве McPherson et al. (2000) *PCR -Basics: From Background to Bech*, First Edition, Springer Verlag, Germany. Стандартные процедуры анализа AFLP описываются в Vos et al. (1995, NAR 23:4407-4414) и в опубликованной ЕР патентной заявке EP 534858.

### Примеры

Пример 1. Выделение последовательностей ДНК генов IND.

Для определения последовательностей генов IND элитной линии бридинга озимого масличного рапса скринировали библиотеку бактериальных искусственных хромосом (BAC) линии согласно следующему.

#### 1.1. Выделение клонов BAC, содержащих последовательность IND.

Для идентификации колоний *Escherichia coli*, содержащих клон BAC, содержащий последовательность IND элитной линии бридинга озимого масличного рапса, скринировали библиотеку BAC линии (средний размер клона более 120 т.о.), составленную в виде отдельных дуплицированных клонов на наноновых фильтрах высокой плотности, путем стандартных процедур гибридизации по Саузерну.

Смесь двух зондов с последовательностью SEQ ID NO: 2 WO 04/113542 ("Bn1-IND") и SEQ ID NO: 3 WO 04/113542 ("BN2-IND") (SEQ ID NO: 11 и 12, соответственно) и меченых в соответствии со стандартными процедурами использовали для гибридизации с ДНК на наноновой мембране.

Предгибридизацию осуществляли в течение 2 ч при 65°C в 30 мл следующего гибридизационного буфера: 6-кратный SSC (20-кратный SSC содержит 3,0M NaCl, 0,3M Na-цитрат, pH 7,0), 5-кратный раствор Денхардта (100-кратный раствор Денхардта содержит 2% фикола, 2% поливинилпирролидон, 2% бычий сывороточный альбумин), 0,5% SDS и денатурированная ДНК-носитель в концентрации 20 мкг/мл (одноцепочечная ДНК спермы рыбы со средней длиной 120-3000 нуклеотидов)

Гибридизацию осуществляли в следующих условиях:

меченый зонд (20 нг каждой последовательности) денатурировали нагревом в течение 5 мин при 95°C и охлаждением на льду в течение 5 мин и добавляли гибридизационный буфер до 15 мл (тот же буфер что и для предгибридизации);

гибридизацию осуществляли в течение ночи при 65°C;

блоты отмывали три раза в течение 30 минут при 65°C в пробирках для проведения гибридизации (один раз с помощью 30 мл 6-кратного SSC с 0,1% SDS и дважды с помощью 30 мл 2-кратного SSC с 0,1% SDS) и один раз в течение 10 минут при 65°C с помощью 500 мл 2-кратного SSC с 0,1% SDS в камере;

пленки Kodak X-OMAT AR экспонировали с радиоактивными блотами в течение 4 ч при -70°C;

на основании положительных сигналов отбирали 14 колоний *E. coli*, содержащих клон BAC, содержащий последовательность IND, посредством скрининга библиотеки BAC элитной линии бридинга озимого масличного рапса (общее количество положительных сигналов: 65) (далее в данном документе обозначаемых "положительными колониями").

#### 1.2. Выделение клонов BAC, содержащих полноразмерную последовательность IND.

Для идентификации положительных колоний, содержащих клон BAC с полноразмерной последовательностью геномной ДНК одного из генов IND, осуществляли анализ саузерн-блот на ДНК клона BAC, выделенной из положительных колоний и на геномной ДНК, выделенной из *Brassica napus*.

ДНК клона BAC выделяли посредством щелочного лизиса, описанного в данной области, из положительных колоний, выращенных в 25 мл бульонной питательной среды Луриа, содержащей хлорамфеникол в концентрации 25 мкг/мл.

Геномную ДНК выделяли из ткани листьев растения *B. napus* в соответствии со способом с использованием цетилтриметиламмонийбромид (CTAB) (Doyle и Doyle, 1987, *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15).

Концентрацию ДНК каждого препарата оценивали сравнением интенсивности полосы 1 мкл каждого образца с интенсивностью полосы 1, 2, 4, 8 и 20 мкл раствора, содержащего 25 нг/мкл ДНК фага лямбда (продукция фирмы Life Technologies®), на агарозном геле (продукция фирмы Roche®) с концентрацией ТВЕ 1% (продукция фирмы Invitrogen®), содержащем этидиумбромид (продукция фирмы ICN Biochemicals®).

100-200 нг ДНК клона ВАС и 1,7 мкг геномной ДНК расщепляли с помощью рестриктазы EcoRI в конечном реакционном объеме 20 мкл, применяя условия, предложенные производителем (New England Biolabs). Время расщепления и/или количество рестриктазы доводили до достижения полного расщепления образцов геномной ДНК без неспецифической деградаци.

После расщепления к образцам расщепленной ДНК добавляли 2 мкл наносимого красителя, содержащего РНК-азу (12,5 мл 1% ксиленианола FF; 12,5 мл 1% водорастворимого индикатора бромфенолового синего; 25 мл глицерина; 100 мкл 0,5M EDTA pH8; 1мкл РНК-азы (10 мг/мл)) и образцы инкубировали в течение 30 мин при 37°C.

Образцы загружали на 1% ТАЕ-агарозный гель.

ДНК фага лямбда (продукция фирмы Fermentas®), расщепленную с помощью PstI, или ДНК-лестенку с интервалом 1 т.п.о. (продукция фирмы Life Technologies), включали в качестве стандарта размера.

После электрофореза образцы ДНК (расщепленные ДНК клона ВАС и геномная ДНК) переносили на нейлоновую мембрану (продукция фирмы Hybond-N+ Amersham Pharmacia Biotech®) посредством капиллярного блоттинга с безводной щелочью.

Нейлоновые мембраны с расщепленными ДНК клона ВАС и геномной ДНК скринировали с помощью стандартных процедур гибридизации по Саузерну, как описано выше в отношении скринингов библиотеки ВАС, за исключением того, что для геномной ДНК пленки Kodak XOMAT AR экспонировали с радиоактивными блотами в течение 2 дней при -70°C.

На основании сравнения между паттернами гибридизации, полученными после расщепления ДНК клона ВАС идентифицированных положительных колоний и геномной ДНК, выделенной из *Brassica napus*, с помощью рестриктазы EcoRI и гибридизации с зондами, клоны ВАС разделили на 2 группы, и для каждой из 2 групп выбирали клон ВАС, содержащий полноразмерную последовательность IND (обозначенную IND-A1 и IND-C1).

Последовательности IND, содержащиеся в клонах ВАС отобранных положительных колоний, определяли стандартными техниками секвенирования (Agowa).

Таблица 3. Паттерн гибридизации расщепленных ДНК клона ВАС и геномной ДНК, гибридизованных с зондами Bn1- и Bn2-IND

Образец ДНК:	Геномная ДНК из <i>B. napus</i>	ДНК клона ВАС из <i>B. napus</i>	Соответствует
Расщепленная с помощью :	Измеренная длина гибридизовавшихся фрагментов ДНК:		
EcoRI	8 т.о. 2, 2 т.о.	8 т.о. 2, 2 т.о.	IND-A1 IND-C1

Пример 2. Характеристика последовательностей гена IND растения *Brassica napus*.

После секвенирования фрагментов геномной ДНК (SEQ ID NO: 5 и 7, соответственно) кодирующие участки последовательностей IND определяли с помощью программ FgeneSH (Softberry, Inc. Mount Kisco, NY, USA) и est2genome (Rice et al., 2000, *Trends in Genetics* 16 (6): 276-277; Mott, 1997, *Comput. Applic.* 13:477-478), как показано в списке последовательностей.

Сравнение гибридизационных полос, полученных в анализе саузерн-блот, осуществленном на геномной ДНК, выделенной из *B. гара* (AA), *B. oleracea* (CC) и *B. napus* (AACC), и на ДНК клона ВАС, выделенной из положительных колоний, идентифицированных в примере 1 (расщепленной с помощью рестриктазы EcoRI и гибридизованной с зондом, как описано в примере 1), показало, что последовательность IND-A1 получена из генома А и последовательность IND-C1 из генома С.

Белок, кодирующий участки генов IND элитной линии бридинга озимого масличного рапса, представлен в последовательностях SEQ ID NO:1 (IND-A1), SEQ ID NO:3 от нуклеотида в положении 46 до нуклеотида в положении 633 (IND-C1-short) и SEQ ID NO:3 (IND-C1-long), соответственно. Кодированные этими последовательностями нуклеиновых кислот белковые последовательности IND-A1 и IND-C1 представлены в последовательностях SEQ ID NO:2 (IND-A1), SEQ ID NO:4 от аминокислоты в положении 16 до аминокислоты в положении 210 (IND-C1-short) и SEQ ID NO:4 (IND-C1-long), соответственно.

Процент гомологии (нуклеотидных) последовательностей между полными кодирующими участками IND-A1 и IND-C1-long составляет 81% и между полными кодирующими участками IND-A1 и IND-

C1-short составляет 87%, в то время как процент гомологии (нуклеотидных) последовательностей между участками, кодирующими домены bHLH генов IND-A1 и IND-C1-long и -short (определенные согласно Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15, 1749-1770) составляет 98%. Эти проценты указывают на то, что гены IND более консервативны в участке, кодирующем домен bHLH, чем в остальной части кодирующего участка.

Аналогично, процент гомологии (аминокислотных) последовательностей между полным белком IND-A1 и белком IND-C1-long составляет 75% и между полным белком IND-A1 и белком IND-C1-short составляет 80%, в то время как процент гомологии (аминокислотных) последовательностей между доменами bHLH белков IND-A1 и IND-C1-long и -short (определенными согласно Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15, 1749-1770) составляет 98%. Эти проценты указывают на то, что белки IND более консервативны в домене bHLH, чем в остальной части белков IND.

Пример 3. Экспрессия генов IND растения Brassica.

Для анализа экспрессии различных генов IND в различных тканях осуществляли исследования ОТ-ПЦР, специфичные для каждого гена IND, на всей РНК, выделенной из листьев, стенок стручка, ткани зоны раскрытия и семян растения Brassica napus, используя следующие праймеры:

INDA1F1 5' AGGAGAGGAAGAGATGGATCC 3' (SEQ ID No. 37)

INDA1R1 5' TGAGTGTGAGGCTGAAGAAGC 3' (SEQ ID No. 38)

для гена IND-A1, и

INDC1F1 5' CCTCATCATCTCCTTATGAAC 3' (SEQ ID No. 39)

INDC1R 5' CGTATTGCATCTCCTTCATCT 3' (SEQ ID No. 40)

для гена IND-C1.

Результаты показали, что оба гена IND, т.е. IND-A1 и IND-C1, не экспрессировались в ткани листьев и семенах, но экспрессировались в ткани зоны раскрытия, и что ген IND-A1 экспрессировался в стенках стручка, тогда как ген IND-C1 не экспрессировался в стенках стручка.

Пример 4. Получение и выделение мутантных аллелей IND (IND).

Мутации в генах IND, идентифицированных в примере 1, получали и идентифицировали согласно следующему.

30000 семенам элитной линии бридинга озимого масличного рапса (семена M0) предварительно давали набухнуть в течение двух часов на влажной фильтровальной бумаге в деионизованной или дистиллированной воде. Половину семян экспонировали с 0,8% EMS и половину с 1% EMS (продукция фирмы Sigma: M0 880) и инкубировали в течение 4 ч.

Подвергшиеся мутагенизации семена (семена M1) отмывали 3 раза и высушивали в вытяжном шкафу в течение ночи. 30000 растений M1 выращивали в почве и самоопыляли для получения семян M2. Семена M2 собирали для каждого отдельного растения M1.

Два раза по 4800 растений M2, полученных от различных растений M1, выращивали и образцы ДНК получали из образцов листьев каждого отдельного растения M2 согласно способу CTAB (Doyle и Doyle, 1987, Phytochemistry Bulletin 19:11-15).

Образцы ДНК скринировали на наличие точковых мутаций в генах IND, приводящих к встраиванию стоп-кодона в кодирующие белок участки генов IND или замене аминокислот в белках IND, в частности, в домене bHLH белков IND, путем прямого секвенирования с помощью стандартных методик секвенирования (Agowa) и анализа последовательностей на наличие точковых мутаций, используя программное обеспечение NovoSNP (продукция фирмы VIB Antwerp).

Таким образом идентифицировали следующие мутантные аллели IND (ind).

Таблица 4а. Мутации в IND-A1, приводящие к появлению стоп-кодона и замен

Положение амино- кислоты	Положение нуклеотида		Кодон дикого типа→му- тантный	Амино-кислота дикого типа→му- тантная	Растение M2 No.	Аллель No.
	SEQ ID: 2/6	SEQ ID: 1 SEQ ID: 5				
122	364	924	cag→tag	GLN→STOP (в b)	POSH101, POSH102, POSH103, POSH104	ind-a1-EMS01, ind-a1-EMS02, ind-a1-EMS03, ind-a1-EMS04
103	307	867	gat→aat	ASP→ASN	POSH105	ind-a1-EMS05
127	380	940	cgt→cat	ARG→HIS (в b)	POSH105	ind-a1-EMS05

Таблица 4b. Мутации в IND-C1, приводящие к появлению стоп-кодонов

Положение амино- кислоты	Положение нуклеотида		Кодон дикого типа→му- тантный	Аминокислота дикого типа→му- тантная	Растение M2 No.	Аллель No.
SEQ ID: 4/8	SEQ ID: 3	SEQ ID: 7				
50	148	644	<u>caa</u> → <u>taa</u>	GLN→STOP	POSH106	<i>ind-c1-EMS01</i>
135	403	899	<u>cag</u> → <u>tag</u>	GLN→STOP (в b)	POSH108	<i>ind-c1-EMS03</i>

Референсные семена растений, содержащих в гомозиготном состоянии аллели *ind-a1-EMS01* и *ind-a1-EMS01*, были депонированы в Американской коллекции типовых культур (ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, US) 20 ноября 2007 г. под номером доступа PTA-8796 (обозначение штамма 07MBBNO 01171) и референсные семена растений, содержащих в гомозиготном состоянии аллели *ind-a1-EMS05* и *ind-a1-EMS03*, были депонированы в Американской коллекции типовых культур (ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, US) 20 ноября 2007 г. под номером доступа PTA-8795 (обозначение штамма 07MBBNO00530).

В заключение, вышеуказанные примеры показывают, как могут быть получены и выделены мутантные аллели IND. Кроме того, растительный материал, содержащий такие мутантные аллели, может быть использован для комбинирования выбранных мутантных аллелей и/или аллелей дикого типа в одном растении, как описано в следующих примерах.

Пример 5. Идентификация растения Brassies., содержащего мутантный аллель IND Brassica.

Растения Brassica, содержащие мутации в генах IND, идентифицированные в примере 4, идентифицировали согласно следующему.

Для каждого мутантного гена IND, идентифицированного в образце ДНК растения M2, выращивали, по меньшей мере, 50 растений M2, полученных из того же растения M1, что и растение M2, содержащее мутацию IND, и из образцов листьев каждого отдельного растения M2 получали образцы ДНК.

Образцы ДНК скринировали на наличие идентифицированной точечной мутации IND, как описано выше в примере 4.

Гетерозиготные и гомозиготные (что определяли на основании электрофореграмм) растения M2, содержащие ту же мутацию, самоопыляли и собирали семена M3.

Пример 6. Анализ характеристик раскрытия плода растений Brassies., содержащих мутантный ген IND Brassies.

Для определения корреляции между наличием мутантных генов IND в растениях Brassica и характеристиками раскрытия плода растений Brassica анализировали характеристики раскрытия плода растений Brassica, содержащих мутантный ген IND, в теплице и в полевых условиях согласно следующему:

Для оценки того, зависят ли и как зависят края створок плода и характеристики раскрытия семенных стручков от мутаций в IND, плод *ind* сравнивали с плодом дикого типа, используя следующие макроскопические тесты.

(а) Оценка семенных стручков и растений в целом невооруженным глазом для определения различий в фенотипе стручков и растений, обусловленных наличием некоторых мутантных аллелей IND. Определение фенотипа стручков: Если стручки полностью вырастали и наполнялись непосредственно перед пожелтением, то степень заостренности зоны, которая ограничивает створку и носик в зоне, где обе створки больше не касаются (в дистальном конце стручка), из 5 случайным образом взятых стручков (от различных растений при доступности большого числа растений на линию) авторы изобретения оценивали по 5-балльной шкале: 1 для четкого вдавления и тонкозаостренной зоны, которая отделяет створку и носик; 2 для некоторого вдавления и четкой, хотя и более расплывчатой зоны, которая отделяет створку от носика; 3 для створок и носика, которые все еще заметны в виде двух различных тканей, но с очень плавным переходом между ними; 4 для створок и носика, которые с трудом наблюдаются в виде различных тканей; 5 для полностью сглаженного перехода между створками и носиком без какого-либо четкого различия между обоими типами тканей, т.е. чем меньше вдавление между створкой и носиком на дистальном конце стручков тем больше балл. Балл 1 (заостренное вдавление между створкой и носиком) соответствует фенотипу дикого типа стручков, конкретнее фенотипу стручков, чувствительному к раскалыванию стручка; балл от 2 до 4 (более плавный переход между створкой и носиком) соответствует фенотипу стручков, устойчивому к раскрытию стручка, где осыпание семян существенно снижено или задержано, тогда как агрономически подходящая обмолачиваемость стручков сохраняется, так что стручки все-таки могут быть открыты вдоль зоны раскрытия, применяя ограниченные физические усилия; и балл 5 (отсутствие вдавления между створкой и носиком) соответствует фенотипу стручков, устойчивому к раскрытию стручка, где осыпание семян снижается или задерживается до степени, которая больше не позволяет агрономически подходящей обмолачиваемости стручков, так что стручки не могут быть раскрыты вдоль зоны раскрытия, прикладывая ограниченные физические усилия.

(b) Тест удара рукой (MIT) для определения повышения устойчивости к раскрытию стручка, обу-

словленного наличием некоторых мутантных аллелей IND: уровень устойчивости к раскрытию стручка линий Brassica, содержащих мутантные аллели IND, и линий Brassica, содержащих соответствующие аллели IND дикого типа, сравнивали полукочечным способом, определяя физические усилия, необходимые для раскрытия закрытых зрелых стручков путем надавливания вручную на стручки. Различали стручки, которые полностью раскрывались вдоль зоны раскрытия при самом слабом нажатии, стручки, которые раскрывались лишь в основании зоны раскрытия, и требовалось более сильное нажатие для полного раскрытия, и стручки, которые могут быть лишь раздроблены и не раскрываются вдоль зоны раскрытия. Устойчивость стручков к раскрытию стручка оценивали по 5-балльной шкале, исходя из этого физического усилия: 1 для стручков, которые полностью открываются вдоль зоны раскрытия на самое малое усилие, 2-4 для стручков, которые открываются лишь в основании зоны раскрытия, и требуется более значительное усилие для раскрытия полностью, и 5 для стручков, которые могут быть лишь раздроблены и не раскрываются вдоль зоны раскрытия.

(с) Тест случайного удара (RIT) для определения повышения устойчивости к раскрытию стручка, обусловленного наличием некоторых мутантных аллелей IND: уровень устойчивости к раскрытию стручка линий Brassica, содержащих мутантные аллели IND, и линий Brassica, содержащих соответствующие аллели IND дикого типа, сравнивали количественно, определяя период полужизни образцов стручков из обеих линий согласно статье Bruce et al. (2002, выше). Конкретнее, два повторенных образца из 20 интактных зрелых стручков каждой линии подвергали тесту RIT. 20 стручков помещали вместе с шестью стальными шариками диаметром 12,5 мм в цилиндрический контейнер диаметром 20 см в вертикальном положении. Контейнер затем подвергали простому гармоническому колебанию с частотой 4,98 Гц и отдельным ходом 51 мм в горизонтальной плоскости. Стручки, проверенные перед тестом на прочность, встряхивали в течение общего времени 10, 20, 40, и если более 50% стручков оставалось интактными, 80 с. Контейнер открывали после каждого периода и подсчитывали количество закрытых стручков. Стручки оценивали и классифицировали как "закрытые", если зона раскрытия обеих створок была все еще закрыта. Таким образом, стручки классифицировали как "открытые", если одна или обе створки отсоединялись, так что семена высвобождались. При разломе или повреждении большинства стручков без открытия зоны раскрытия образец отмечали как "неучтенный". Для получения равновесия каждой точки данные получали с равными промежутками по независимой переменной, времени, добавляя 1 и получая  $\log 10$ . Процент раскрытых стручков  $p$  преобразовывали посредством логит-преобразования, т.е. логит  $p = \log_e (p/100-p)$ . К преобразованным данным по времени и проценту затем подбирали линейную модель и использовали для оценки периода полужизни.

(d) Полевые тесты для определения взаимосвязи между устойчивостью к раскрытию стручка, обмолачиваемостью и урожаем и наличием некоторых мутантных аллелей IND в растениях: уровень устойчивости к раскрытию стручка, обмолачиваемость и урожай линий Brassica, содержащих мутантные аллели IND, и линий Brassica, содержащих соответствующие аллели IND дикого типа, сравнивали полукочечным способом, определяя и сравнивая уровень осыпания семян (SHAT), возможность сбора комбайном (CHA1) и возможность обмолота (CHA2), и количественным способом, определяя и сравнивая урожай семян на опытный участок после уборки комбайном (YLDP) и урожай семян после обмолота соломой (Y LDS) в полевых условиях между опытными участками с растениями IND и опытными участками с растениями дикого типа. Для указания уровня осыпания семян на опытном участке до сбора урожая опытные участки оценивали по 9-балльной шкале: от балла 1 для указания, что практически все растения на данном опытном участке осыпались перед сбором урожая, до балла 9 для указания, что практически ни одно растение на опытном участке не осыпалось до сбора урожая. Для указания уровня возможности сбора комбайном на опытном участке опытные участки оценивали по 5-балльной шкале: балл от 1 до 3 или до 5 для указания, что собрать урожай с опытного участка с помощью комбайна было затруднительно, возможно или легко, соответственно. Для указания уровня возможности обмолота опытного участка опытные участки оценивали по 5-балльной шкале: балл от 1 до 3 или до 5 для указания, что собрать вручную урожай семян, оставшихся в соломе после сбора урожая комбайном, было затруднительно, возможно или легко, соответственно. Урожай семян на опытный участок после уборки комбайном (YLDP; выраженный в граммах на опытный участок) определяли, собирая семена на опытном участке с помощью комбайнера и взвешивая семена, и урожай семян после обмолота соломой (Y LDS; выраженный в % масс, соломой) определяли сбором вручную семян, оставшихся в соломе после сбора семян с помощью комбайнера.

Для более точной оценки того, влияют ли и как влияют на клетки по краю створки семенных стручков мутации в IND, срезы плода ind сравнивали со срезами плода дикого типа с помощью микроскопической оценки семенных стручков.

Эксплантаты: из растений, выращенных в теплице (по два стручка для каждого генотипа) и/или в полевых условиях, собирали эксплантаты около 3 мм, взятые из проксимального и дистального концов стручков на аналогичной стадии развития (около 35 дней после цветения (DAA), стадия развития, которая точно соответствует появлению видимого пожелтения перикарпия) и одинакового размера. Обе зоны раскрытия вырезали из стручков.

Фиксация: фиксацию осуществляли в 100 мМ К-фосфатном буфере, pH 7, с помощью 10% раствора

формалина и 0,25% раствора глутаральдегида в течение в целом 4 часов. Вакуумную инфильтрацию осуществляли после 1 и 2 ч в течение 15 мин. Фиксатор обновляли после каждой вакуумной инфильтрации.

Дегидратация: образец отмывали 2 раза по 30 минут с помощью 100 мМ К-фосфатного буфера, pH 7. Дегидратацию осуществляли с помощью технического этанола, разбавленного с помощью 0,85% NaCl в воде: 60 мин (') в 50% этаноле, 90' в 70% этаноле, 90' в 80% этаноле, 90' в 90% этаноле, 90' в 95% этаноле, 90' в 100% этаноле при комнатной температуре.

Заливка: заливку осуществляли с помощью наборов для заливки Leica 7022-31731 Histo-resin или Kulzer Histo-Technik 7100 (продукция фирмы Heraeus), которые представляют собой трехкомпонентные смоляные (основная смола, активатор и отвердитель) наборы. Три компонента использовались в пропорциях, предложенных производителем, согласно следующему: образец инкубировали в течение 4 ч в смеси 50% этанол/50% основная смола, в течение ночи в смеси 30% этанол/70% основная смола (необязательно: при 4°C), в течение от 2 до 4 ч в 100% основной смоле, в течение одного дня в 100% основной смоле после восстановления основной смолы и вакуумной инфильтрации в течение 20' (необязательно при 4°C), в течение одного дня в основной смоле + активатор (1%) ("среда для инфильтрации") после вакуумной инфильтрации в этой среде в течение 20 мин. Образец отмывали с помощью состава основная смола + активатор (1%) + отвердитель (1 мл в 15 мл) ("заливочная среда"). Заливку осуществляли в плоских формах для заливки (плоские формы для заливки AGAR G3531 с полостями около 300 мкл: 14 мм в длину x 6 мм в ширину x 4 мм в глубину): добавляли 100-125 мкл заливочной среды/полость, заливочную среду полимеризовали при 55°C в течение около одного часа, ткань помещали на полимеризованную заливочную среду (1 эксплантат/полость), полости осторожно полировали заливочной средой, заливочную среду полимеризовали в течение от 3 до 5 ч при 55°C, формы охлаждали, пластиковые блоки вынимали из форм и сохраняли при комнатной температуре в запаянном контейнере (например, пробирке типа эппендорф).

Изготовление срезов: Пластиковые блоки наклеивали с плоской стороны на плексиглазый блок объемом 1 см и обрезали под прямым углом вокруг образца. Срезы толщиной 4 мкм (от 3 до 4 эксплантатов на генотип, около 25 срезов на эксплантат) получали с помощью стеклянного ножа Ральфа (1 позиция производителя гистологических ножей фирмы Reichert-Jung, используя стеклянные стержни толщиной 6 мм под углом среза около 6°) на микротоме. Срезы фиксировали на предметных стеклах, обработанных с помощью пленки Vectabond (продукция фирмы Vector laboratories).

Демонстрация лигнина: неокрашенные срезы, помещенные в заливочную среду Eukitt, оценивали, используя микроскоп, оснащенный для флуоресценции (набором фильтров Zeiss 02). Лигнин флуоресцирует ярко синим.

Гистологическая оценка: неокрашенные срезы визуализировали, используя микроскопию DIC-Normaski или аутофлуоресценцию (с помощью набора фильтров Zeiss 18 возбуждение BP390-420; излучение LP450).

6.1. Корреляция между наличием одного или двух мутантных аллелей IND Brassica в растениях рода Brassica и характеристиками раскрытия плода этих растений Brassica.

Для определения корреляции между наличием одного аллеля IND в гетерозиготном состоянии (генотип: IND-A1/ind-a1, IND-C1/IND-C1; или IND-A1/IND-A1, IND-C1/ind-c1) или в гомозиготном состоянии (генотип: ind-a1/ ind-a1, IND-C1/ IND-C1 или IND-A1/IND-A1, ind-c1/ind-c1) в растениях рода Brassica и характеристиками раскрытия плода данного растения Brassica растения Brassica, идентифицированные в примере 5 (в частности гомозиготные растения M2 No. POSH101, POSH103, POSH104, POSH105 и POSH106 и гетерозиготные растения M2 No. POSH105; см. табл. 4a и b в отношении соответствующих аллелей IND), выращивали в теплице и анализировали, как описано выше. Значительного различия в фенотипе и характеристиках раскрытия плода между растениями дикого типа и этими гетерозиготными и гомозиготными растениями с одной мутацией обнаружено не было.

Полевые тесты с гомозиготными растениями с одной мутацией по аллелю ind (генотип: ind-a1/ ind-a1, IND-C1/ IND-C1 или IND-A1/IND-A1, ind-c1/ind-c1) и растениями дикого типа (генотип: IND-A1/IND-A1, IND-C1/IND-C1) из отдельных популяций возвратного скрещивания 3 (BC3) показали, тем не менее, повышение урожая семян у гомозиготных растений с одной мутацией по аллелю ind (см. табл. ниже).

Генотип	SHAT (1- 9)	CHA1 (1- 5)	CHA2 (1- 5)	YLDP (в г/участок)	YieldWTseg%	YLDs (в % масс. соломы)
<i>ind-a1-01/ind-a1-01</i> , <i>IND-C1/IND-C1</i>	8,0	4,9	5,0	2636,0	106	0,8
<i>IND-A1/IND-A1</i> , <i>IND-C1/IND-C1</i>	7,8	4,9	5,0	2490,0	100	0,7
<i>ind-a1-05/ind-a1-05</i> , <i>IND-C1/IND-C1</i>	8,1	4,8	5,0	2450,9	103	0,3
<i>IND-A1/IND-A1</i> , <i>IND-C1/IND-C1</i>	7,6	5,0	4,8	2387,6	100	0,4
<i>ind-a1/ind-a1</i> , <i>IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,3	4,9	5,0	2856,0	113	0,6
<i>IND-A1/IND-A1</i> , <i>IND-C1/IND-C1</i>	8,3	4,8	5,0	2517,3	100	0,3
<i>IND-A1/IND-A1</i> , <i>Ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8,6	4,7	4,9	2833,6	113	0,5
<i>IND-A1/IND-A1</i> , <i>IND-C1/IND-C1</i>	8,1	4,6	5,0	2510,7	100	0,4

6.2. Корреляция между наличием, по меньшей мере, трех мутантных аллелей IND Brassica в растениях Brassica и характеристиками раскрытия плода этих растений Brassica.

Для определения корреляции между наличием, по меньшей мере, трех мутантных аллелей IND в растениях Brassica и характеристиками раскрытия плода данного растения Brassica растения Brassica, идентифицированные в примере 5, и/или их потомство, содержащие мутантные аллели IND, скрещивали друг с другом и анализировали характеристики раскрытия плода потомства растений Brassica, как описано выше.

Растительный материал.

Потомство (т.е. гомозиготные растения двойные мутанты с генотипом *ind-a1/ind-a1*, *ind-c1/ind-c1*; гомозиготные и гетерозиготные растения с одной мутацией, т.е. растения тройные мутанты с генотипом *ind-a1/ind-a1*, *IND-C1/ind-c1* и *IND-A1/ind-a1*, *ind-c1/ind-c1*; и растения дикого типа с генотипом *IND-A1/IND-A1*, *IND-C1/IND-C1*) линии 51, линии 45, линии 176 и линии 48, которые сами по себе гетерозиготны (генотип: *IND-A1/ind-a1*, *IND-C1/ind-c1*) по аллелям *IND-A1-EMS01* и *IND-C1-EMS01* (линия 51), аллелям *IND-A1-EMS01* и *IND-C1-EMS03* (линия 45), аллелям *IND-A1-EMS05* и *IND-C1-EMS01* (линия 176) и аллелям *IND-A1-EMS05* и *IND-C1-EMS03* (линия 48), соответственно.

Макроскопическая оценка.

а) Рассмотрение семенных стручков и растений невооруженным глазом.

У стручков от двойных гомозиготных мутантных по IND растений-сисбсов (генотип: *ind-a1/ind-a1*, *ind-c1/ind-c1*), полученных от линий 51, 45, 176 и 48, наблюдалась измененная морфология стручка даже на незрелой стадии по сравнению со стручками растений-сисбсов дикого типа по IND. Конкретнее, у стручков двойных гомозиготных мутантных по IND растений-сисбсов наблюдался недостаток четкости собственно края створки, особенно проявляющийся как на проксимальном, так и на дистальном конце плода, по сравнению со стручками растений-сисбсов дикого типа по IND, у которых наблюдались четко очерченные края. Более того, заостренное вдавление между створкой и носиком на дистальном конце стручков у растений-сисбсов дикого типа в основном отсутствовало у двойных гомозиготных по IND растений-сисбсов, у которых наблюдался более плавный переход между створкой и тканью носика. У цветков двойных гомозиготных мутантных по IND растений-сисбсов линии 51 иногда наблюдались деформированные лепестки в условиях теплицы. Более того, стручки растений, полученных от линии 45, в целом оказались меньше, чем стручки растений, полученных из других линий. Поскольку это отличие в размере наблюдалось как у растений-сисбсов дикого типа, так и у мутантных по IND, полученных из линии 45, это возможно вызывается фоновой мутацией в этой линии.

У стручков растений, содержащих один аллель *ind* в гомозиготном состоянии и один аллель *ind* в гетерозиготном состоянии (генотип: *ind-a1/ind-a1*, *IND-C1/ind-c1* или *IND-A1/ind-a1*, *ind-c1/ind-c1*) наблюдался промежуточный фенотип. Конкретнее, края створок стручков этих мутантных по IND растений-сисбсов в основном четче определяются, чем у двойных гомозиготных мутантных по IND растений-сисбсов, но заостренное вдавление между створкой и носиком на дистальном конце стручков, наблюдаемое у растений-сисбсов дикого типа, все же в основном отсутствовало у этих мутантных растений.



В табл. 5а представлены визуальные баллы стручков, приписываемые фенотипу стручков растений, выращенных в полевых условиях, как описано выше.

Таблица 5а

Генотип	Линия n°	Визуальный балл стручка (1-5)
<i>IND-A1/IND-A1, IND-C1/IND-C1</i>	51	1
	45	1
	176	1
	48	1
<i>ind-a1/ind-a1, IND-C1/ind-c1</i>	51	3
	45	3
	176	2
	48	3
<i>IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1</i>	51	3
	45	3
	176	2
	48	3
<i>ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1</i>	51	5
	45	5
	176	4
	48	5

b) Тест удара рукой (MIT).

Стручки растений, содержащих два мутантных аллеля IND в гомозиготном состоянии (генотип: *ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*), полученных из линий 51, 45, 176 и 48, оказались полностью устойчивыми к раскалыванию стручка (стручки не раскрылись вдоль зоны раскрытия даже после применения значительного скручивания).

Устойчивость к раскалыванию стручка у стручков растений, содержащих один аллель IND в гомозиготном состоянии и один аллель IND в гетерозиготном состоянии (генотип: *ind-a1/ind-a1, IND-C1/ind-c1* или *IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1*) повышалась по сравнению с устойчивостью к раскалыванию стручка у стручков растений-сисбсов дикого типа, но стручки могли все-таки раскрыться вдоль зоны раскрытия после приложения ограниченных физических усилий.

В табл. 5b показаны баллы, приписываемые стручкам растений, выращенных в полевых условиях, исходя из физического усилия, требуемого для открытия закрытых зрелых стручков путем скручивания рукой стручков, как описано выше:

Таблица 5b

Генотип	Линия n°	Балл, исходя из физического усилия, требуемого для открытия закрытых зрелых стручков (1-5)
<i>IND-A1/IND-A1, IND-C1/IND-C1</i>	51	1
	45	1
	176	1
	48	1
<i>ind-a1/ind-a1, IND-C1/ind-c1</i>	51	3
	45	3
	176	1
	48	2
<i>IND-A1/ind-a1, ind-c1/ind-c1</i>	51	3
	45	2
	176	1
	48	3
<i>ind-a1/ind-a1, ind-c1/ind-c1</i>	51	ND
	45	ND
	176	ND
	48	ND

ND: не определен.

с) Тест случайного удара.

Как показано в табл. 5с, период полужизни образцов стручков ('LD50') оказался существенно выше у стручков гомозиготных двойных мутантов (генотип *ind-a1/ind-a1*, *ind-cl/ind-cl*), полученных из линии 51, чем у стручков гомозиготных двойных мутантов, полученных из линии 45, указывая на то, что гомозиготные двойные мутантные растения, содержащие аллель IND-C1-EMS01 (линия 51) оказались более устойчивы к раскалыванию стручка, чем гомозиготные двойные мутантные растения, содержащие аллель IND-C1-EMS0 3 (линия 45).

В табл. 5с дополнительно показано, что величина LD50 в целом оказалась выше у стручков растений, содержащих один аллель *ind-cl* в гомозиготном состоянии и один аллель *ind-a1* в гетерозиготном состоянии (генотип: *IND-A1/ind-a1*, *ind-cl/ind-cl*), чем у стручков растений, содержащих один аллель *ind-a1* в гомозиготном состоянии и один аллель *ind-cl* в гетерозиготном состоянии (генотип: *ind-a1/ind-a1*, *IND-C1/ind-cl*), указывая на то, что мутации в аллеле IND-C1 могут оказывать более сильное влияние на устойчивость к раскалыванию стручка, чем мутации в аллеле IND-A1.

Таблица 5с

Генотип	Линия n°	LD50-теплица			LD50- поле1	LD50- поле2
			Ниже 95%	Выше 95%		
<i>IND-A1/IND-A1</i> , <i>IND-C1/IND-C1</i>	51	8,61	6,56	11,08	8,9	6,8
	45	8,07	6,08	10,45	7,8	5,7
	176	ND			5,3	5,3
	48	11,42	7,42	14,9	9	5,3
	48	8,86	*	*		
<i>ind-a1/ind-a1</i> , <i>IND-C1/IND-C1</i>	48	9,86	5,89	13,3	ND	ND
<i>IND-A1/IND-A1</i> , <i>ind-cl/ind-cl</i>	48	5,98	2,87	8,6	ND	ND
<i>ind-a1/ind-a1</i> , <i>IND-C1/ind-cl</i>	51	14,22	11,33	17,79	21,1	21,4
	51	22,78	18,68	27,8		
	45	14,97	11,95	18,74	22,9	24,6
	45	10,32	8,05	13,05		
	176	ND			7,3	8,6
	48	7,21	3,04	9,7	10,1	9,4
<i>IND-A1/ind-a1</i> , <i>ind-cl/ind-cl</i>	51	48,31	39,94	58,73	16,9	22,6
	51	46,46	38,44	56,41		
	45	26,89	22,03	32,95	20,6	14,6
	45	17,5	13,96	22,01		
	176	ND			10,9	8,0
	48	30,14	25,49	36,8	18,3	16,5
<i>ind-a11/ind-a1</i> <i>ind-cl/ind-cl</i>	51	163,28	116,12	237,62	ND	ND
	45	73,57	53,85	103,54	ND	ND
	176	ND			ND	ND
	48	115,99	66,35	523,4	ND	ND

\* Доступно недостаточно данных для оценки верхней и нижней границ LD50.

d) Испытания в полевых условиях.

В табл. 5d показан уровень осыпания семян (SHAT), возможности сбора комбайном (CHA1), возможности обмолота (CHA2), урожай семян на опытный участок после сбора комбайнером

(YLDP) и урожай семян после обмолачивания соломы (Y LDS), определенные, как описано выше для полевых опытных участков с указанными растениями *ind* и растениями дикого типа. Величина YieldWTSeg% представляет собой YLDP в виде процента растений дикого типа, выделенных в одной линии, т.е. в линии 51, 45, 176 или 48, соответственно.

Таблица 5d

Генотип	Линия n°	SHAT (1-9)	CHA1 (1-5)	CHA2 (1-5)	YLDP (в г/участок)	YieldW TSeg%	YLDs (в % масс. соломы)
<i>IND-A1/IND-A1</i> , <i>IND-C1/IND-C1</i>	51	8,1	4,9	5,0	2154,7	100	0,6
	45	8,4	4,2	4,8	1868,7	100	0,8
	176	8,1	4,6	5,0	1710,2	100	0,3
	48	7,9	4,7	5,0	1844,2	100	0,5
<i>ind-a1/ind-a1</i> , <i>IND-C1/ind-c1</i>	51	8,9	2,9	3,8	2450,7	114	4,5
	45	8,8	2,3	3,3	2304,2	123	7,6
	176	8,7	3,9	4,9	2189,6	128	0,6
	48	8,8	4,1	4,9	2419,1	131	1,4
<i>IND-A1/ind-a1</i> , <i>ind-c1/ind-c1</i>	51	8,9	3,3	4,3	2739,6	127	1,9
	45	8,8	2,6	3,4	2441,6	131	3,4
	176	8,7	4,1	4,9	2071,6	121	0,7
	48	8,8	3,6	4,1	2379,8	129	2,4
<i>ind-a1/ind-a1</i> , <i>ind-c1/ind-c1</i>	51	9,1	1,2	2,0	515,3	24	27,4
	45	9,0	1,0	2,0	424,4	23	27,4
	176	9,0	1,1	2,6	702,4	41	21,0
	48	9,0	1,0	1,9	447,3	24	27,7

## Микроскопическая оценка.

У стручков растений, содержащих два аллеля *ind* в гомозиготном состоянии, полученных из линии 45 (генотип *ind-a1/ind-a1*, *ind-c1/ind-c1*), выращенных в условиях теплицы, наблюдалась лигнификация на протяжении полной зоны раскалывания и слабая дифференциация клеток, относящихся к зоне раскалывания, от окружающих типов клеток, таких как клетки сосудистой ткани и лигнифицированный слой клеток, обычно расположенный на внутренней стенке стручка (т.е. клетки *enb*) ("сильный морфологический фенотип"). Аналогичный фенотип стручка наблюдался у этих растений, выращенных в полевых условиях. Напротив, у стручков растений, содержащих два аллеля *IND* в гомозиготном состоянии, полученных из линии 51 (генотип *ind-a1/ind-a1*, *ind-c1/ind-c1*), выращенных в условиях теплицы, зоны раскалывания оказались все-таки хорошо дифференцированы и в основном нелигнифицированы, но у зон раскалывания наблюдалась повышенная лигнификация, когда стенки стручка смыкаются ("более слабый морфологический фенотип"). У стручков этих растений, выращенных в полевых условиях, наблюдался паттерн лигнификации, аналогичный паттерну стручков растений с генотипом *IND-A1/ind-a1*, *ind-c1/ind-c1*, полученных из линии 45, описанной ниже. При сочетании с данными, полученными из теста RIT, эти данные могут указывать на то, что у этих растений комбинируется "более слабый морфологический фенотип" с большей устойчивостью к раскрытию стручка.

У стручков растений, содержащих один аллель *IND* в гомозиготном состоянии и один аллель *ind* в гетерозиготном состоянии, полученных из линий 45 и 51 (генотип: *ind-a1/ind-a1*, *IND-C1/ind-c1* или *IND-A1/ind-a1*, *ind-c1/ind-c1*), выращенных в условиях теплицы, не наблюдался четкий фенотип. В полевых условиях у стручков растений с генотипом *IND-A1/ind-a1*, *ind-c1/ind-c1*, полученных из линий 45, наблюдался более трудно различимый морфологический фенотип, чем у стручков растений их гомозиготных двойных мутантных сибсов (см. выше). Конкретнее, лигнификация не произошла вдоль всей зоны раскалывания, но у стручков этих растений наблюдалось лишь несколько дополнительных слоев лигнифицированных клеток, когда внутренняя стенка стручка присоединяется к перемычке либо симметрично по обе стороны перемычки, либо лишь унимально. Аналогичный фенотип стручка наблюдался у стручков растений с генотипом *IND-A1/ind-a1*, *ind-c1/ind-c1*, полученных из линий 51, выращенных в полевых условиях. У стручков растений с генотипом *ind-a1/ind-a1*, *IND-C1/ind-c1*, полученных из линий 45 и 51, не наблюдался очевидный фенотип в полевых условиях.

Пример 7. Детекция и/или перенос мутантных генов *IND* в (элитные) линии *Brassica*.

Мутантные гены *IND* переносят в (элитные) линии бридинга *Brassica* следующим способом.

Растение, содержащее мутантный ген *IND* (растение донор), скрещивают с (элитной) линией *Brassica* (элитный родитель/рекуррентный родитель) или большим числом линий с нехваткой мутантного гена *IND*. Используют следующую схему интрогрессии (мутантный ген *IND* обозначают *ind*, тогда как ген дикого типа обозначают *IND*).

Первичное скрещивание: *ind ind* (растение донор) x *IND/IND* (элитный родитель)

Растение F1: *IND/ind*.

Скрещивание BC1: *IND/ind* x *IND/IND* (рекуррентный родитель)

Растения BC1: 50% *IND/ind* и 50% *IND/IND*

50% IND/ind отбирают, используя молекулярные маркеры (например, AFLP, PCR, Invader™, и подобные; см. также ниже) для мутантного аллеля IND (ind).

Скрещивание BC2 : IND/ind (растение BC1) x IND/IND (рекуррентный родитель)

Растения BC2: 50% IND/ind и 50% IND/IND

50% IND/ind отбирают, используя молекулярные маркеры для мутантного аллеля IND (ind).

Возвратное скрещивание повторяют до получения BC3-BC6

Растения BC3-6: 50% IND/ind и 50% IND/IND

50% IND/ind отбирают, используя молекулярные маркеры для мутантного аллеля IND (ind). Для уменьшения количества возвратных скрещиваний (например, до BC3 вместо BC6) могут быть использованы молекулярные маркеры, специфичные для генетического фона элитного родителя.

Скрещивание BC3-6 S1: IND/ind x IND/ind

Растения BC3-6 S1: 25% IND/IND и 50% IND/ind и 25% ind/ind

Растения, содержащие ind, отбирают, используя молекулярные маркеры для мутантного аллеля IND (ind). Отдельные растения BC3-6 S1, которые гомозиготны по мутантному аллелю IND (ind/ind), отбирают, используя молекулярные маркеры для мутантных аллелей IND и аллеля IND дикого типа. Эти растения затем используют для продукции семян.

Для селекции растений, содержащих точковую мутацию в аллеле IND, может использоваться прямое секвенирование стандартными техниками секвенирования, известными в данной области, такими как описанные в примере 4. Альтернативно, для различения растений, содержащих специфическую точковую мутацию в аллеле IND, от растений, не содержащих эту специфическую точковую мутацию, могут быть разработаны исследования ПЦР. Для детекции наличия или отсутствия и статуса зиготности мутантных аллелей, идентифицированных в примере 4 (см. табл. 4), разрабатывали, таким образом, следующие дискриминирующие исследования ПЦР:

Матричная ДНК:

геномная ДНК, выделенная из материала листьев гомозиготных или гетерозиготных мутантных растений Brassica (содержащих мутантный аллель IND, далее в данном документе обозначаемый "IND-Xx-EMSXX").

Контрольная ДНК дикого типа: геномная ДНК, выделенная из материала листьев растений Brassica дикого типа (содержащих эквивалент дикого типа мутантного аллеля IND, далее в данном документе обозначаемый "IND-Xx-WT").

ДНК положительного контроля: геномная ДНК, выделенная из материала листьев гомозиготных мутантных растений Brassica, как известно, содержащих IND-Xx-EMSXX.

Праймеры и длина фрагмента, амплифицируемого с мутантного мишенного гена IND или соответствующего гена дикого типа, указаны в табл. 6. В целом, каждый набор праймеров состоит из одного праймера, специфичного для мутантного мишенного гена и мишенного гена дикого типа (например, праймер POSH101R2 специфичен для IND-A1-EMS01 и IND-A1-WT) и одного праймера, специфичного для нуклеотидного различия (например, праймер POSH101MF1 специфичен для IND-A1-EMS01 и праймер POSH101WF1 специфичен для IND-A1-WT). Обычно последний нуклеотид второго праймера совместим с нуклеотидным различием (подчеркнутый нуклеотид в табл. 6), но для улучшения отжига между праймером и его мишенной последовательностью может(гут) быть добавлен(ы) один (или несколько) дополнительный(ых) мишенный(ых) специфический(их) нуклеотид(ов) (см., например, выделенный жирным шрифтом нуклеотид в праймере POSH 108MR1', который специфичен для аллеля IND-C1-EMS03, в отличие от праймера POSH 108WR1', который специфичен для аллеля IND-C1-WT).

Смесь для проведения ПЦР: 2,5 мкл 10-кратного буфера для проведения ПЦР (15 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,25 мкл каждого dNTP (20 mM), 1 мкл прямого праймера (10 мкМ), 1 мкл обратного праймера (10 мкМ), 0,25 мкл Taq-полимеразы (5 Ед/мкл), 19,5 мкл Milli-Q H<sub>2</sub>O, 0,5 мкл ДНК (20-50 нг/мкл) = Общий объем 25 мкл.

Термоциклический профиль: 4 мин при 95°C; 30 раз [1 мин при 95°C (денатурация) и 1 мин при температуре отжига, указанной в табл. 6, и 2 мин при 72°C (удлинение)]; 5 мин при 72°C; охлаждение до 4°C. Оптимальную температуру отжига определяли по градиенту температуры ПЦР, в котором температура отжига варьировала от 57 до 70°C на термоциклере MJ Research PTC-200 (продукция фирмы Biozym). Оптимальная температура отжига для праймеров, специфичных для IND дикого типа, представляет собой ту температуру, при которой может быть детектирован четкий ПЦР-фрагмент ожидаемого размера (как описано ниже) для образца ДНК из растения Brassica дикого типа, но не для образца ДНК из мутантного растения Brassica. Оптимальная температура отжига для праймеров, специфичных для мутантного IND, представляет собой ту температуру, при которой может быть детектирован четкий ПЦР-фрагмент ожидаемого размера (как описано ниже) для образца ДНК из мутантного растения Brassica, но не для образца ДНК из растения Brassica дикого типа.

После амплификации к 15 мкл образцов ПЦР добавляли 5 мкл загрузочного красителя (оранжевый краситель), и образцы загружали на 1,5% агарозный гель.

Паттерны полос, полученные после амплификации геномной ДНК мутантных растений Brassica, оценивали согласно следующему.

Данные по образцам ДНК, выделенным из материала листьев мутантных растений Brassica в ходе одной ПЦР и в одной ПЦР-смеси, не должны учитываться за исключением следующих случаев:

в контрольной ДНК дикого типа наблюдается ПЦР-фрагмент ожидаемого размера для ПЦР-исследования, специфичного для IND-Xx-WT, и не наблюдается ПЦР-фрагмент ожидаемого размера для ПЦР-исследования, специфичного для IND-Xx-EMSXX;

в ДНК положительного контроля наблюдается ПЦР-фрагмент ожидаемого размера для ПЦР-исследования, специфичного для IND-Xx-EMSXX, и не наблюдается ПЦР-фрагмент ожидаемого размера для ПЦР-исследования, специфичного для IND-Xx-WT;

дорожки, где не наблюдается ПЦР-продукт ожидаемого размера для ПЦР-исследования, специфичного для IND-Xx-WT, и ПЦР-фрагмент ожидаемого размера для ПЦР-исследования, специфичного для IND-Xx-EMSXX, указывают на то, что соответствующее растение, из которого получена геномная матричная ДНК, представляет собой гомозиготный мутант по IND-Xx-EMSXX;

дорожки, где наблюдается ПЦР-фрагмент ожидаемого размера для ПЦР-исследования, специфичного для IND-Xx-WT, и ПЦР-исследования, специфичного для IND-Xx-EMSXX, указывают на то, что соответствующее растение, из которого получена геномная матричная ДНК, представляет собой гетерозиготный мутант по IND-Xx-EMSXX;

дорожки, где наблюдается ПЦР-фрагмент ожидаемого размера для ПЦР-исследования, специфичного для IND-Xx-WT, и не наблюдается ПЦР-продукт ожидаемого размера для ПЦР-исследования, специфичного для IND-Xx-EMSXX, указывают на то, что соответствующее растение, из которого получена геномная матричная ДНК, представляет собой растение дикого типа.

Таблица 6

Аллель No.	Праймеры	Отжиг t° (°C)	Размер ПЦР- фрагмента (нп)
IND-A1-EMS01	5' AAGGGTAAGCGACGACCCCTT 3' (POSH101MF1 - SEQ ID NO: 13) 5' GAGTGTGAGGCTGAAGAAGC 3' (POSH101R2 - SEQ ID NO: 15)	67	191
IND-A1-WT	5' AAGGGTAAGCGACGACCCCTC 3' (POSH101WF1 - SEQ ID NO: 14) 5' GAGTGTGAGGCTGAAGAAGC 3' (POSH101R2 - SEQ ID NO: 15)	71,1	191
IND-A1-EMS05	5' CCTCAGACGGTGGTGGCTCA 3' (POSH105MF1 - SEQ ID NO: 16) 5' AGGGTCAGACATAGGAGCTC 3' (POSH 101R1 - SEQ ID NO: 18)	70	201
IND-A1-WT	5' CCTCAGACGGTGGTGGCTCG 3' (POSH105WF1 - SEQ ID NO: 17) 5' AGGGTCAGACATAGGAGCTC 3' (POSH 101R1 - SEQ ID NO: 18)	72	201
IND-C1-EMS01	5' GTGGTTAAAGAGTTTCTTAA 3' (POSH106MR1 - SEQ ID NO: 19) 5' ATTAGCATGTAAACACTAG 3' (POSH106F1 - SEQ ID NO: 21)	60,6	436
IND-C1-WT	5' GTGGTTAAAGAGTTTCTTG 3' (POSH106WR1 - SEQ ID NO: 20) 5' ATTAGCATGTAAACACTAG 3' (POSH106F1 - SEQ ID NO: 21)	62,8	436
IND-C1-EMS03	5' ACGAGCCACCACCGTCTAG 3' (POSH 108MR1' - SEQ ID NO: 22) 5' GTTCAAAAGCAGATGCAGCAG 3' (POSH106F2 - SEQ ID NO: 24)	70	369
IND-C1-WT	5' ACGAGCCACCACCGTCTG 3' (POSH 108WR1' - SEQ ID NO: 23) 5' GTTCAAAAGCAGATGCAGCAG 3' (POSH106F2 - SEQ ID NO: 24)	68,9	369

Альтернативно, для различения растений, содержащих специфическую точковую мутацию в аллеле IND, и растений, не содержащих этой специфической точковой мутации, может быть использована технология Invader™ (Third Wave Agbio). Для определения наличия или отсутствия и статуса зиготности мутантных аллелей, идентифицированных в примере 4, разрабатывали, таким образом, следующие дискриминирующие зонды Invader™ (см. табл. 7).

Зонды, специфичные для мутантного мишенного гена IND или соответствующего гена дикого типа (указанные как "5' flap1-x" и "5' flap2-x", соответственно) и "инвазивные" зонды, которые могут быть использованы в сочетании с ними, указаны в табл. 7. Как правило, каждый набор зондов состоит из одного зонда, специфичного для мутантного мишенного гена или мишенного гена дикого типа, у которого первый нуклеотид после последовательности 5' flap совместим с нуклеотидным различием (подчеркнутый нуклеотид в табл. 7) (также называемого "первичный зонд"; например, зонд с последовательностью SEQ ID NO: 26 специфичен для IND-A1-EMS01 и зонд с последовательностью SEQ ID NO: 27 специфичен для IND-A1-WT), и одного зонда, специфичного для нуклеотидов выше нуклеотидного различия (также называемого "invader® oligo"; например, зонд с последовательностью SEQ ID NO: 25 специфичен для нуклеотидов выше нуклеотидного различия между IND-A1-EMS01 и IND-A1-WT). Последний нуклеотид второго праймера может быть совместим с нуклеотидным различием в мутанте (указанным с помощью выделенных жирным нуклеотидов в табл. 6), но другие нуклеотиды могут быть использованы также для этого последнего нуклеотида при условии, что первичный зонд и олиго invader® все-таки способны образовывать однонуклеотидное перекрытие при гибридизации с мишенной ДНК для получения специфической инвазивной структуры, распознаваемой ферментами Cleavase® (Third Wave Agbio).

Процедуру исследования Invader™ и интерпретацию данных осуществляют, как предписано производителем (Third Wave Agbio). Вкратце, нуклеотидные последовательности, указанные как "flap1" и "flap2" в табл. 7, представляют последовательности 5' "flaps", которые отщепляются от первичных зондов в начальную фазу исследования Invader™ и которые комплементарны последовательностям в кассете 1 и 2 FRET™, соответственно, и не комплементарны мишенным мутантным последовательностям или мишенной последовательности дикого типа. При расщеплении первичных зондов в начальную фазу и гибридизации зонда flap1 и/или зонда flap2 с кассетой 1 и 2 FRET™, соответственно, во вторую фазу создается сигнал, указывающий на наличие в образце мутантного или соответствующего мишенного гена IND дикого типа, соответственно.

Таблица 7

Аллель No.	Зонды	
IND-A1-EMS01	5' GCCGACGAGCCACCACCGTCT <b>T</b> 3'	(SEQ ID NO: 25)
	5' flap1- <u>A</u> AGGGTCGTCGCTT 3'	(SEQ ID NO: 26)
IND-A1-WT	5' GCCGACGAGCCACCACCGTCT <b>T</b> 3'	(SEQ ID NO: 25)
	5' flap2- <u>G</u> AGGGTCGTCGCTT 3'	(SEQ ID NO: 27)
IND-A1-EMS05	5' GATCTTCTCGCTTATCCTTTCTCTACGCCGA <b>A</b> 3'	(SEQ ID NO: 28)
	5' flap1- <u>T</u> GAGCCACCACCG 3'	(SEQ ID NO: 29)
IND-A1-WT	5' CGGATCTTCTCGCTTATCCTTTCTCTACGCCGA <b>A</b> 3'	(SEQ ID NO: 28)
	5' flap2- <u>C</u> GAGCCACCACCG 3'	(SEQ ID NO: 30)
IND-C1-EMS01	5' AGGTGGATCTACCATGAAATGAGGATTGTGGTT AAAAGAGTTTCTT <b>T</b> 3'	(SEQ ID NO: 31)
	5' flap1- <u>A</u> TGTAATGAGATCAATAGGTTTG 3'	(SEQ ID NO: 32)
	5' AGGTGGATCTACCATGAAATGAGGATTGTGGTT AAAAGAGTTTCTT <b>T</b> 3'	(SEQ ID NO: 31)
	5' flap2- <u>G</u> TGTAATGAGATCAATAGGTTTG 3'	(SEQ ID NO: 33)
IND-C1-EMS03	5' CCGTAACGTAAGGGTAAGCGAGGACCC <b>C</b> A 3'	(SEQ ID NO: 34)
	5' flap1- <u>T</u> AGACGGTGGTGGC 3'	(SEQ ID NO: 35)
	5' CCGTAACGTAAGGGTAAGCGAGGACCC <b>C</b> A 3'	(SEQ ID NO: 34)
	5' flap2- <u>C</u> AGACGGTGGTGGC 3'	(SEQ ID NO: 36)

## Список последовательностей

<110> Bayer BioScience N.V.

<120> Растение рода *Brassica*, содержащее мутантный аллель INDEHISCENT

<130> BCS 07-2014

<160> 40

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 558

<212> ДНК

<213> Кодирующая последовательность IND-A1 дикого типа растения *Brassica napus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(555)

<400> 1

atg tct ggc tca aaa gca gat gca gcc ata gcc cca ata gtc atg atg	48
Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met	
1 5 10 15	
gag cat cat cat ctc ctt atg aat tgg aac aaa cct att gat ctc att	96
Glu His His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile	
20 25 30	
aca gaa gaa aac tct ttt aac cac aat cct cat ttc ata gta gat cca	144
Thr Glu Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Ile Val Asp Pro	
35 40 45	
cct tcc gaa acc cta agc cac ttc cag ccc ccg ccg aca atc ttc tcc	192
Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Ile Phe Ser	
50 55 60	
gat cac gga gga gga gag gaa gca gaa gaa gaa gaa gaa gaa gaa gga	240
Asp His Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly	
65 70 75 80	
gag gaa gag atg gat ccg atg aag aag atg caa tac gcg att gct gcc	288
Glu Glu Glu Met Asp Pro Met Lys Lys Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala	
85 90 95	
atg cag ccc gta gac ctc gat cca gcc acc gtt cct aag ccg aac cgc	336
Met Gln Pro Val Asp Leu Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg	
100 105 110	
cgt aac gta agg gta agc gac gac cct cag acg gtg gtg gct cgt cgg	384
Arg Asn Val Arg Val Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg	
115 120 125	
cgt aga gaa agg ata agc gag aag atc cgg ata ttg aag agg atg gtg	432
Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val	
130 135 140	
cca ggc ggt gca aag atg gac act gcc tcc atg ctc gac gaa gcc atc	480
Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile	
145 150 155 160	
cgc tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg cta gct tct tca gcc	528

Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Ala Ser Ser Ala  
 165 170 175

tca cac tca gct tgg agc tcc tat gtc tga 558  
 Ser His Ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val  
 180 185

<210> 2

<211> 185

<212> PRT

<213> Кодированная последовательность IND-A1 дикого типа растения *Brassica napus*

<400> 2

Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met  
 1 5 10 15

Glu His His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile  
 20 25 30

Thr Glu Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Ile Val Asp Pro  
 35 40 45

Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Ile Phe Ser  
 50 55 60

Asp His Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly  
 65 70 75 80

Glu Glu Glu Met Asp Pro Met Lys Lys Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala  
 85 90 95

Met Gln Pro Val Asp Leu Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg  
 100 105 110

Arg Asn Val Arg Val Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg  
 115 120 125

Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val  
 130 135 140

Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile  
 145 150 155 160

Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Ala Ser Ser Ala  
 165 170 175

Ser His Ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val  
 180 185

<210> 3



<211> 633  
 <212> ДНК  
 <213> Кодированная последовательность IND-C1 дикого типа растения *Brassica napus*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(630)

```

<400> 3
atg tat aaa aga aag gtc tat gcg tct cta gtc caa aaa ctc tat atg      48
Met Tyr Lys Arg Lys Val Tyr Ala Ser Leu Val Gln Lys Leu Tyr Met
1          5          10          15

tct ggt tca aaa gca gat gca gca gcc ata gcc cca ata gtc atg atg      96
Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met
          20          25          30

gag cct cat cat ctc ctt atg aac tgg aac aaa cct att gat ctc att     144
Glu Pro His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile
          35          40          45

aca caa gaa aac tct ttt aac cac aat cct cat ttc atg gta gat cca     192
Thr Gln Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Met Val Asp Pro
          50          55          60

cct tcc gaa acc cta agc cac ttc cag ccc ccg ccg aca gtc ttc tcc     240
Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Val Phe Ser
        65          70          75          80

gat ccc gga gga gga gag gaa gca gaa gac gaa gaa gga gag gaa gag     288
Asp Pro Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu
          85          90          95

ata gat gag atg aag gag atg caa tac gcg att gct gcc atg cag ccc     336
Ile Asp Glu Met Lys Glu Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala Met Gln Pro
          100          105          110

gta gac atc gat cca gcc acc gtt cct aag ccg aac cgc cgt aac gta     384
Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg Arg Asn Val
          115          120          125

agg gta agc gag gac ccc cag acg gtg gtg gct cgt ccg cgt aga gaa     432
Arg Val Ser Glu Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg Arg Arg Glu
          130          135          140

agg ata agc gag aag atc cgg ata ttg aag agg atg gtg cca ggc ggt     480
Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val Pro Gly Gly
          145          150          155          160

gca aag atg gac act gcc tcc atg ctt gac gaa gcc atc cgc tac acc     528
Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile Arg Tyr Thr
          165          170          175

aag ttc ttg aaa ccg cag gtg agg ctt ctt cag cct cac act cag ctt     576
Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Leu Gln Pro His Thr Gln Leu
          180          185          190

ggg gct cct atg tct gac cct tct cgc ctt tgt tat tac cac aac tcg     624
Gly Ala Pro Met Ser Asp Pro Ser Arg Leu Cys Tyr Tyr His Asn Ser
          195          200          205

gat acc taa
Asp Thr
633

```

210

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 210

&lt;212&gt; PRT

<213> Кодирующая последовательность IND-C1 дикого типа растения *Brassica napus*

&lt;400&gt; 4

Met Tyr Lys Arg Lys Val Tyr Ala Ser Leu Val Gln Lys Leu Tyr Met  
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met  
 20 25 30

Glu Pro His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile  
 35 40 45

Thr Gln Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Met Val Asp Pro  
 50 55 60

Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Val Phe Ser  
 65 70 75 80

Asp Pro Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu  
 85 90 95

Ile Asp Glu Met Lys Glu Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala Met Gln Pro  
 100 105 110

Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg Arg Asn Val  
 115 120 125

Arg Val Ser Glu Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg Arg Arg Glu  
 130 135 140

Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val Pro Gly Gly  
 145 150 155 160

Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile Arg Tyr Thr  
 165 170 175

Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Leu Gln Pro His Thr Gln Leu  
 180 185 190

Gly Ala Pro Met Ser Asp Pro Ser Arg Leu Cys Tyr Tyr His Asn Ser  
 195 200 205

Asp Thr  
 210

```
<210> 5
<211> 1622
<212> ДНК
<213> Геномная последовательность IND-A1 дикого типа растения Brassica napus
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (561) .. (1118)
```

[illegible]

Val Val Ala Arg Arg Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile  
 125 130 135

ttg aag agg atg gtg cca ggc ggt gca aag atg gac act gcc tcc atg 1025  
 Leu Lys Arg Met Val Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met  
 140 145 150 155

ctc gac gaa gcc atc cgc tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg 1073  
 Leu Asp Glu Ala Ile Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg  
 160 165 170

cta gct tct tca gcc tca cac tca gct tgg agc tcc tat gtc tga 1118  
 Leu Ala Ser Ser Ala Ser His Ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val  
 175 180 185

cccttcttgc ctttgttatt accacaactc ggatacctaa ttataattct atcacgcgtt 1178

tcatgttgat atatatagat aaatggtcga ataaggattt cgategaaga ttgtatgtac 1238

aataaatgat gtgtgtatatt caattaatgt atgatataata tatatatatg tatgcagtat 1298

gcattttatat tctattctct ataaggaggc aacattgccg gattagggct ttgatcttat 1358

gcaagttttc cgaccaaaaa tatgaaatac ttgtttggat ataacatatg aatcggataa 1418

gtgttactag ttatataact ggaaaacaaa tgtctggaat aagaattccc gggagaacca 1478

agcctttctc taatccctaa gattatagct actgaaacaa tgaaacaatg aagaatcagt 1538

tgggcattag taataaaaaa agaatcagtt gggttgctta taataatttg ttataaaatt 1598

tatgtcgtat gtgtgttagc cgta 1622

<210> 6  
 <211> 185  
 <212> PRT  
 <213> Геномная последовательность IND-A1 дикого типа растения *Brassica napus*

<400> 6

Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met  
 1 5 10 15

Glu His His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile  
 20 25 30

Thr Glu Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Ile Val Asp Pro  
 35 40 45

Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Ile Phe Ser  
 50 55 60

Asp His Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly  
 65 70 75 80

Glu Glu Glu Met Asp Pro Met Lys Lys Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala  
 85 90 95

Met Gln Pro Val Asp Leu Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg  
 100 105 110

Arg Asn Val Arg Val Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg  
 115 120 125

Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val  
 130 135 140

Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile  
 145 150 155 160

Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Ala Ser Ser Ala  
 165 170 175

Ser His Ser Ala Trp Ser Ser Tyr Val  
 180 185

<210> 7  
 <211> 1593  
 <212> ДНК  
 <213> Геномная последовательность IND-C1 дикого типа растения *Brassica napus*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (497)..(1126)

<400> 7  
 tgccatacat aaccacggat catagtcgac acctcaacgt gaagcaaatt tgacaatcta 60  
 catacataac caacaaaaag tagaataccg tgaaaaccta aacccaaaat atgatgtaaa 120  
 actcaagcgtt ggtccagagc ataaaaaaat taaagccatc gctttggtat cacatattta 180  
 aacgtcagtt tttttttggg gaagtaatat aaaaatataa ttaacaagaa aatttatgaa 240  
 ataattagca tgtaaaacac tagtccttttg gttgtgacaa aacgttttca caaatgttct 300  
 ataaataaat tcaagcacat tttatctgca aaatatatac tttcactcat aaaataagag 360  
 cgttttaaac attcatatac gcactacatt gacatgacaa aagaaatccg caaatacaaa 420  
 catatttagt tcggatatat ctaggaaata agactatatt atatataaa agaaattaga 480  
 aaaaaagaaa attggt atg tat aaa aga aag gtc tat gcg tct cta gtc caa 532  
 Met Tyr Lys Arg Lys Val Tyr Ala Ser Leu Val Gln  
 1 5 10  
 aaa ctc tat atg tct ggt tca aaa gca gat gca gca gcc ata gcc cca 580  
 Lys Leu Tyr Met Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ala Ile Ala Pro  
 15 20 25  
 ata gtc atg atg gag cct cat cat ctc ctt atg aac tgg aac aaa cct 628  
 Ile Val Met Met Glu Pro His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro  
 30 35 40

att gat ctc att aca caa gaa aac tct ttt aac cac aat cct cat ttc Ile Asp Leu Ile Thr Gln Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe 45 50 55 60	676
atg gta gat cca cct tcc gaa acc cta agc cac ttc cag ccc ccg ccg Met Val Asp Pro Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro 65 70 75	724
aca gtc ttc tcc gat ccc gga gga gga gag gaa gca gaa gac gaa gaa Thr Val Phe Ser Asp Pro Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Asp Glu Glu 80 85 90	772
gga gag gaa gag ata gat gag atg aag gag atg caa tac gcg att gct Gly Glu Glu Glu Ile Asp Glu Met Lys Glu Met Gln Tyr Ala Ile Ala 95 100 105	820
gcc atg cag ccc gta gac atc gat cca gcc acc gtt cct aag ccg aac Ala Met Gln Pro Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn 110 115 120	868
cgc cgt aac gta agg gta agc gag gac ccc cag acg gtg gtg gct cgt Arg Arg Asn Val Arg Val Ser Glu Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg 125 130 135 140	916
cgg cgt aga gaa agg ata agc gag aag atc cgg ata ttg aag agg atg Arg Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met 145 150 155	964
gtg cca ggc ggt gca aag atg gac act gcc tcc atg ctt gac gaa gcc Val Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala 160 165 170	1012
atc cgc tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg ctt ctt cag cct Ile Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Leu Gln Pro 175 180 185	1060
cac act cag ctt ggg gct cct atg tct gac cct tct cgc ctt tgt tat His Thr Gln Leu Gly Ala Pro Met Ser Asp Pro Ser Arg Leu Cys Tyr 190 195 200	1108
tac cac aac tcg gat acc taattataat tctatcacgc gtttcatggt Tyr His Asn Ser Asp Thr 205 210	1156
gatatatata gataaatggt tgaataagga tttcgatcga agattgtatg gctattgatt	1216
acattatata ttgtacaata aatgatgtgt gtatttctat taatgtatat atgatatata	1276
tctgtttgca gtatgcattt atattctatt ctttataggg aggcaacatg ccggattagg	1336
gctttgatcg tatgcaagtt ttccgaccaa aaatatgaaa tacttggttg gatataacat	1396
atgaatcgga taagtgttac tagttatata actggaaaaa attgtttggt ataagaattc	1456
ccggggagaac caagcctttc tctaatacct aagatcatag ctactgaaat aatgaaaaaa	1516
aacaaaaaaa aaacaatgaa gaatcagttg ggcattagtc caaaaaaaa aaagaatcag	1576
ttggattgct tataaaa	1593
<210> 8	
<211> 210	
<212> PRT	

<213> Геномная последовательность IND-C1 дикого типа растения *Brassica napus*

<400> 8

Met Tyr Lys Arg Lys Val Tyr Ala Ser Leu Val Gln Lys Leu Tyr Met  
1 5 10 15

Ser Gly Ser Lys Ala Asp Ala Ala Ala Ile Ala Pro Ile Val Met Met  
20 25 30

Glu Pro His His Leu Leu Met Asn Trp Asn Lys Pro Ile Asp Leu Ile  
35 40 45

Thr Gln Glu Asn Ser Phe Asn His Asn Pro His Phe Met Val Asp Pro  
50 55 60

Pro Ser Glu Thr Leu Ser His Phe Gln Pro Pro Pro Thr Val Phe Ser  
65 70 75 80

Asp Pro Gly Gly Gly Glu Glu Ala Glu Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu  
85 90 95

Ile Asp Glu Met Lys Glu Met Gln Tyr Ala Ile Ala Ala Met Gln Pro  
100 105 110

Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn Arg Arg Asn Val  
115 120 125

Arg Val Ser Glu Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg Arg Arg Arg Glu  
130 135 140

Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Met Val Pro Gly Gly  
145 150 155 160

Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala Ile Arg Tyr Thr  
165 170 175

Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Leu Leu Gln Pro His Thr Gln Leu  
180 185 190

Gly Ala Pro Met Ser Asp Pro Ser Arg Leu Cys Tyr Tyr His Asn Ser  
195 200 205

Asp Thr  
210

<210> 9

<211> 597

<212> ДНК

<213> *Arabidopsis thaliana* IND1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(594)

&lt;400&gt; 9

atg gaa aat ggt atg tat aaa aag aaa gga gtg tgc gac tct tgt gtc	48
Met Glu Asn Gly Met Tyr Lys Lys Lys Gly Val Cys Asp Ser Cys Val	
1 5 10 15	
tcg tcc aaa agc aga tcc aac cac agc ccc aaa aga agc atg atg gag	96
Ser Ser Lys Ser Arg Ser Asn His Ser Pro Lys Arg Ser Met Met Glu	
20 25 30	
cct cag cct cac cat ctc ctc atg gat tgg aac aaa gct aat gat ctt	144
Pro Gln Pro His His Leu Leu Met Asp Trp Asn Lys Ala Asn Asp Leu	
35 40 45	
ctc aca caa gaa cac gca gct ttt ctc aat gat cct cac cat ctc atg	192
Leu Thr Gln Glu His Ala Ala Phe Leu Asn Asp Pro His His Leu Met	
50 55 60	
tta gat cca cct ccc gaa acc cta att cac ttg gac gaa gac gaa gag	240
Leu Asp Pro Pro Pro Glu Thr Leu Ile His Leu Asp Glu Asp Glu Glu	
65 70 75 80	
tac gat gaa gac atg gat gcg atg aag gag atg cag tac atg atc gcc	288
Tyr Asp Glu Asp Met Asp Ala Met Lys Glu Met Gln Tyr Met Ile Ala	
85 90 95	
gtc atg cag ccc gta gac atc gac cct gcc acg gtc cct aag ccg aac	336
Val Met Gln Pro Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn	
100 105 110	
cgc cgt aac gta agg ata agc gac gat cct cag acg gtg gtt gct cgt	384
Arg Arg Asn Val Arg Ile Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg	
115 120 125	
cgg cgt cgg gaa agg atc agc gag aag atc cga att ctc aag agg atc	432
Arg Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Ile	
130 135 140	
gtg cct ggt ggt gcg aag atg gac aca gct tcc atg ctc gac gaa gcc	480
Val Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala	
145 150 155 160	
ata cgt tac acc aag ttc ttg aaa cgg cag gtg agg att ctt cag cct	528
Ile Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Ile Leu Gln Pro	
165 170 175	
cac tct cag att gga gct cct atg gct aac ccc tct tac ctt tgt tat	576
His Ser Gln Ile Gly Ala Pro Met Ala Asn Pro Ser Tyr Leu Cys Tyr	
180 185 190	
tac cac aac tcc caa ccc tga	597
Tyr His Asn Ser Gln Pro	
195	

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 198

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana IND1



&lt;400&gt; 10

Met Glu Asn Gly Met Tyr Lys Lys Lys Gly Val Cys Asp Ser Cys Val  
 1 5 10 15

Ser Ser Lys Ser Arg Ser Asn His Ser Pro Lys Arg Ser Met Met Glu  
 20 25 30

Pro Gln Pro His His Leu Leu Met Asp Trp Asn Lys Ala Asn Asp Leu  
 35 40 45

Leu Thr Gln Glu His Ala Ala Phe Leu Asn Asp Pro His His Leu Met  
 50 55 60

Leu Asp Pro Pro Pro Glu Thr Leu Ile His Leu Asp Glu Asp Glu Glu  
 65 70 75 80

Tyr Asp Glu Asp Met Asp Ala Met Lys Glu Met Gln Tyr Met Ile Ala  
 85 90 95

Val Met Gln Pro Val Asp Ile Asp Pro Ala Thr Val Pro Lys Pro Asn  
 100 105 110

Arg Arg Asn Val Arg Ile Ser Asp Asp Pro Gln Thr Val Val Ala Arg  
 115 120 125

Arg Arg Arg Glu Arg Ile Ser Glu Lys Ile Arg Ile Leu Lys Arg Ile  
 130 135 140

Val Pro Gly Gly Ala Lys Met Asp Thr Ala Ser Met Leu Asp Glu Ala  
 145 150 155 160

Ile Arg Tyr Thr Lys Phe Leu Lys Arg Gln Val Arg Ile Leu Gln Pro  
 165 170 175

His Ser Gln Ile Gly Ala Pro Met Ala Asn Pro Ser Tyr Leu Cys Tyr  
 180 185 190

Tyr His Asn Ser Gln Pro  
 195

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 643

&lt;212&gt; ДНК

<213> Нуклеотидная последовательность гомолога INDEHISCENT растения *Brassica napus* (Bn1-IND - SEQ ID NO: 2 WO04/113542)

&lt;400&gt; 11

gaattcgccc ttcgcatgta taaaaagaag ggtctatgcg tctctagtcc aaaaactcta 60

tatgtctggt tcaaaagcag atgcagcagc catagcccca atagtcatga tggagcctca	120
tcattctcctt atgaactgga acaaacctat tgatctcatt acacaagaaa actcttttaa	180
ccacaatcct catttcatgg tagatccacc ttccgaaacc ctaagccact tccagccccc	240
gccgacagtc ttctccgac cgggaggagg agaggaagca gaagacgaag aaggagagga	300
agagatagat gagatgaagg agatgcaata cgcgattgct gccatgcagc ccgtagacat	360
cgatccagcc accgttccta agccgaaccg ccgtaacgta agggtaagcg aggaccccca	420
gacgggtggtg gctcgtcggc gtagagaaag gataagcgag aagatccgga tattgaagag	480
gatggtgcca ggcggtgcaa agatggacac tgcctccatg cttgacgaag ccatccgcta	540
caccaagttc ttgaaacggc aggtgaggct tcttcagcct cacactcagc ttggggctcc	600
tatgtctgac ccttctcgcc tttgttatta ccacaactct caa	643

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 660

&lt;212&gt; ДНК

<213> Нуклеотидная последовательность второго гомолога INDEHISCENT растения *Brassica napus* (Bn2-IND - SEQ ID NO: 3 WO04/113542)

&lt;400&gt; 12

gaattcgccc ttggcatgta caagaagaaa ggtctatgcg tctctagtcc aaaaactcta	60
tatatgtctg gctcaaaagc agatgcagcc atagcccca tagtcatgat ggagcatcat	120
catctcctta tgaattggaa caaacctatt gatctcatta cagaagaaaa ctcttttaac	180
cacaatcctc atttcatagt agatccacct tccgaaacct taagccactt ccagcccccg	240
ccgacaatct tctccggtca cggaggagga gaggaagcag cagaagaaga agaagaagaa	300
ggagaggaag agatggatcc gatgaagaag atgcaatacg cgattgctgc catgcagccc	360
gtagacctcg atccagccac cgcttcctaag ccgaaccgcc gtaacgtaag ggtaagcgac	420
gaccctcaga cgggtggtggc tcgtcggcgt agagaaagga taagcgagaa gatccgata	480
ttgaggagga tgggtgccagg cggtgcaaag atggacactg cctccatgct cgacgaagcc	540
atccgctaca ccaagttctt gaaacggcag gtgaggctag cttcttcagc ctcacactca	600
gcttgagagct cctatgtctg acccttcttg cctttgttat taccataact cgcagccctg	660

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственный

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Прямой олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS01

&lt;400&gt; 13

aagggttaagc gacgaccctt 20

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Прямой олигонуклеотид для детекции IND-A1-WT  
  
 <400> 14  
 aagggtgaagc gacgaccctc 20  
  
  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Обратный олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS01 и -WT  
  
 <400> 15  
 gagtgtgagg ctgaagaagc 20  
  
  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Прямой олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS05  
  
 <400> 16  
 cctcagacgg tgggtggctca 20  
  
  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Прямой олигонуклеотид для детекции IND-A1-WT  
  
 <400> 17  
 cctcagacgg tgggtggctcg 20  
  
  
 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Обратный олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS05 и -WT  
  
 <400> 18  
 aggggtcagac ataggagctc 20  
  
  
 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный

<220>  
 <223> Обратный олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS01  
  
 <400> 19  
 gtgggttaaaa gagtttttctt a 21  
  
 <210> 20  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Обратный олигонуклеотид для детекции IND-C1-WT  
  
 <400> 20  
 gtgggttaaaa gagtttttctt g 21  
  
 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Прямой олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS01 и -WT  
  
 <400> 21  
 attagcatgt aaaacactag 20  
  
 <210> 22  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Обратный олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS03  
  
 <400> 22  
 acgagccacc accgtctag 19  
  
 <210> 23  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Обратный олигонуклеотид для детекции IND-C1-WT  
  
 <400> 23  
 acgagccacc accgtctg 18  
  
 <210> 24  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Прямой олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS03 и -WT

<400> 24	
gttcaaaagc agatgcagca g	21
<210> 25	
<211> 22	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS01 и -WT	
<400> 25	
gccgacgagc caccaccgtc tt	22
<210> 26	
<211> 14	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS01	
<400> 26	
aagggtcgtc gctt	14
<210> 27	
<211> 13	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> Олигонуклеотид для детекции IND-A1-WT	
<400> 27	
gagggtcgtc gct	13
<210> 28	
<211> 34	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS05 и -WT	
<400> 28	
cggatcttct cgcttatacct ttctctacgc cga	34
<210> 29	
<211> 13	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS05	
<400> 29	
tgagccacca ccg	13

<210> 30  
 <211> 13  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для детекции IND-A1-WT  
  
 <400> 30  
 cgaгссасса ссg 13

<210> 31  
 <211> 48  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS01 и -WT  
  
 <400> 31  
 aggtggatct accatgaaat gaggattgtg gttaaaagag ttttcttt 48

<210> 32  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS01  
  
 <400> 32  
 atgtaatgag atcaataggt ttg 23

<210> 33  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для детекции IND-C1-WT  
  
 <400> 33  
 gtgtaatgag atcaataggt ttg 23

<210> 34  
 <211> 29  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS03 и -WT  
  
 <400> 34  
 ccgtaacgta agggtaagcg aggacссса 29

<210> 35  
 <211> 14  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный

<220>  
 <223> Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS03  
  
 <400> 35  
 tagacggtgg tggc 14  
  
 <210> 36  
 <211> 14  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид для детекции IND-C1-WT  
  
 <400> 36  
 cagacggtgg tggc 14  
  
 <210> 37  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Прямой олигонуклеотид для детекции IND-A1  
  
 <400> 37  
 aggagaggaa gagatggatc c 21  
  
 <210> 38  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Обратный олигонуклеотид для детекции IND-A1  
  
 <400> 38  
 tgagtgtgag gctgaagaag c 21  
  
 <210> 39  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Прямой олигонуклеотид для детекции IND-C1  
  
 <400> 39  
 cctcatcatc tccttatgaa c 21  
  
 <210> 40  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> Обратный олигонуклеотид для детекции IND-C1  
 <400> 40  
 cgtattgcat ctccttcac t 21

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутантный аллель гена INDEHISCENT (IND) дикого типа с полным нокаутом, где указанный ген IND дикого типа содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(а) нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 или фрагмента SEQ ID NO: 3 от нуклеотида в положении 46 до нуклеотида в положении 633;

(б) нуклеотидной последовательности, кодирующей функциональный белок IND, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или фрагмента SEQ ID NO: 4 от аминокислоты в положении 16 до аминокислоты в положении 210, причем указанный мутантный аллель IND содержит мутированный участок ДНК, в котором один или более нуклеотидов встроены, удалены или замещены по сравнению с соответствующим участком ДНК функционального гена IND дикого типа и где указанный мутантный аллель IND

(а) содержит мутацию, которая приводит к тому, что белок IND не продуцируется;

(б) содержит мутацию со сдвигом рамки считывания или вводом стоп-кодона перед доменом HLH, обеспечивающую образование нефункционального белка IND, не имеющего домена HLH; или

(с) содержит миссенс-мутацию кодона, кодирующего консервативный аргинин в положении, соответствующем положению 127 SEQ ID NO:2, или в положении, соответствующем положению 140 SEQ ID NO: 4, приводящую к замещению указанного консервативного аргинина гистидином;

и где указанный мутантный аллель IND повышает устойчивость к раскрытию стручка у растения, содержащего указанный мутантный аллель IND, по сравнению с растением, содержащим соответствующий аллель IND дикого типа.

2. Мутантный аллель по п.1, содержащий нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы, состоящей из

последовательности SEQ ID NO: 1, где с в положении 364 заменен на t;

последовательности SEQ ID NO: 5, где с в положении 924 заменен на t;

последовательности SEQ ID NO: 1, где g в положении 307 заменен на а и где g в положении 380 заменен на а;

последовательности SEQ ID NO: 5, где g в положении 867 заменен на а, g в положении 940 заменен на а;

последовательности SEQ ID NO: 3, где с в положении 148 заменен на t;

последовательности SEQ ID NO: 7, где с в положении 644 заменен на t;

последовательности SEQ ID NO: 3, где с в положении 403 заменен на t; и

последовательности SEQ ID NO: 7, где с в положении 899 заменен на t.

3. Растение рода Brassica или его часть, в том числе клетка, или семена, или потомство указанного растения, содержащие в своем геноме по меньшей мере один мутантный аллель IND по п.1 или 2, где указанное растение рода Brassica имеет повышенную устойчивость к раскрытию стручка по сравнению с растением, содержащим аллель IND дикого типа.

4. Растение по п.3, отличающееся тем, что содержит два мутантных аллеля IND.

5. Растение по п.3, отличающееся тем, что содержит три мутантных аллеля IND.

6. Семенной стручок, который получен от растения по любому из пп.3-5, где семя семенного стручка содержит по меньшей мере один мутантный аллель IND по п.1 или 2.

7. Нефункциональный мутантный белок IND, кодируемый мутантным аллелем по п.1 или 2, где указанный нефункциональный мутантный белок IND повышает устойчивость к раскрытию стручка у растения, содержащего указанный мутантный белок IND, по сравнению с растением, содержащим соответствующий белок IND дикого типа.

8. Набор праймеров для идентификации мутантного аллеля IND по п.1 или 2 в биологическом образце, причем указанные праймеры выбраны из группы, состоящей из

праймеров, один из которых представляет собой олигонуклеотид длиной от 17 до около 200 нуклеотидов, содержащий нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 17 нуклеотидов, выбранную из последовательности, фланкирующей с 5'- или 3'-конца мутированный участок ДНК мутантного аллеля IND, как описано в п.1 или 2, или комплементарной ей последовательности, а другой из указанных праймеров представляет собой олигонуклеотид длиной от 17 до около 200 нуклеотидов, содержащий нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 17 последовательных нуклеотидов, выбранную из последовательности мутированного участка ДНК мутантного аллеля IND, как описано в п.1 или 2, или комплементарной ей последовательности,

праймеров, один из которых представляет собой олигонуклеотид длиной от 17 до около 200 нуклеотидов, содержащий нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 17 нуклеотидов, выбранную из последовательности, фланкирующей с 5'- или 3'-конца мутированный участок ДНК мутантного аллеля IND, как описано в п.1 или 2 или комплементарной ей последовательности, а другой из указанных



праймеров представляет собой олигонуклеотид длиной от 17 до около 200 нуклеотидов, содержащий нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 17 нуклеотидов, выбранную из участка стыка между последовательностью, фланкирующей с 3'- или 5'-конца мутированный участок ДНК и мутированным участком ДНК мутантного аллеля IND, как описано в п.1 или 2, или комплементарной ей последовательности.

9. Набор зондов для идентификации мутантного аллеля IND по п.1 или 2 в биологическом образце, причем указанные зонды выбраны из группы, состоящей из

зондов, один из которых представляет собой олигонуклеотид длиной от 13 до около 1000 нуклеотидов, содержащий нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 13 последовательных нуклеотидов, выбранную из последовательности, фланкирующей с 5'- или 3'-конца' мутированный участок ДНК мутантного аллеля IND, как описано в п.1 или 2, или комплементарной ей последовательности, а другой из указанных зондов представляет собой олигонуклеотид длиной от 13 до около 1000 нуклеотидов, содержащий нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 13 последовательных нуклеотидов, выбранную из мутированного участка ДНК мутантного аллеля IND, как описано в п.1 или 2, или комплементарной ему последовательности,

зондов, один из которых представляет собой олигонуклеотид длиной от 13 до около 1000 нуклеотидов, содержащий нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 13 последовательных нуклеотидов, выбранную из последовательности, фланкирующей с 5'- или 3'-конца' мутированный участок ДНК мутантного аллеля IND, как описано в п.1 или 2, или комплементарной ей последовательности, а другой из указанных зондов представляет собой олигонуклеотид длиной от 13 до около 1000 нуклеотидов, содержащий нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 13 последовательных нуклеотидов, выбранную из участка стыка между последовательностью, фланкирующей с 3'- или 5'-конца мутированный участок ДНК и мутированным участком ДНК мутантного аллеля IND, как описано в п.1 или 2, или комплементарной ей последовательности соответственно.

10. Набор по п.8 или 9, где

указанный фланкирующий с 5'- или 3'-конца участок содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 923 или от 925 до 1622 или комплементарной ей соответственно; указанный участок мутации содержит нуклеотид 924 в последовательности SEQ ID NO: 5 или комплементарной ей; и указанный участок стыка содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 924 или от 924 до 1622 или комплементарной ей соответственно, или

указанный фланкирующий с 5'- или 3'-конца участок содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 866 или от 868 до 1622 или комплементарной ей соответственно; или из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 939 или от 941 до 1622 или комплементарной ей соответственно; указанный участок мутации содержит нуклеотид 867 в последовательности SEQ ID NO: 5 или комплементарной ей; или нуклеотид 940 в последовательности SEQ ID NO: 5 или комплементарной ей; и указанный участок стыка содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 867 или от 867 до 1622 или комплементарной ей, или из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 940 или от 940 до 1622 или комплементарной ей соответственно, или

указанный фланкирующий с 5'- или 3'-конца участок содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 643 или от 645 до 1593 или комплементарной ей соответственно; указанный участок мутации содержит нуклеотид 644 в последовательности SEQ ID NO: 7 или комплементарной ей; и указанный участок стыка содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 644 или от 644 до 1593 или комплементарной ей соответственно, или

указанный фланкирующий с 5'- или 3'-конца участок содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 898 или от 900 до 1593 или комплементарной ей соответственно; указанный участок мутации содержит нуклеотид 899 в последовательности SEQ ID NO: 7 или комплементарной ей; и указанный участок стыка содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 899 или от 899 до 1593 или комплементарной ей соответственно.

11. Набор праймеров по п.8 или 10, выбранный из группы, состоящей из

набора праймеров, включающего один праймер, содержащий последовательность SEQ ID NO: 13, и один праймер, содержащий последовательность SEQ ID NO: 15,

набора праймеров, включающего один праймер, содержащий последовательность SEQ ID NO: 16, и один праймер, содержащий последовательность SEQ ID NO: 18,

набора праймеров, включающего один праймер, содержащий последовательность SEQ ID NO: 19, и один праймер, содержащий последовательность SEQ ID NO: 21,

набора праймеров, включающего один праймер, содержащий последовательность SEQ ID NO: 22, и один праймер, содержащий последовательность SEQ ID NO: 24.

12. Набор зондов по п.9 или 10, выбранный из группы, состоящей из

набора зондов, включающего один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 25, и один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 26,

набора зондов, включающего один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 28, и один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 29,

набора зондов, включающего один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 31, и один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 32,

набора зондов, включающего один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 34, и один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 35.

13. Зонд для идентификации мутантного аллеля IND по п.1 или 2 в биологическом образце, представляющий собой олигонуклеотид длиной от 13 до около 1000 нуклеотидов, содержащий нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 13 последовательных нуклеотидов, выбранную из участка стыка между последовательностью, фланкирующей с 3'- или 5'-конца мутированный участок ДНК и мутированным участком ДНК мутантного аллеля IND, как описано в п.1 или 2, или комплементарной ей последовательностью.

14. Зонд по п.13, где

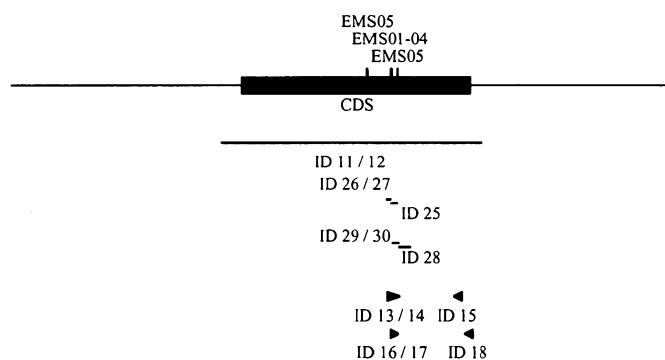
указанный фланкирующий с 5'- или 3'-конца участок содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 923 или от 925 до 1622 или комплементарной ей соответственно; указанный участок мутации содержит нуклеотид 924 последовательности SEQ ID NO: 5 или комплементарной ей; и указанный участок стыка содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 924 или от 924 до 1622 или комплементарной ей соответственно; или

указанный фланкирующий с 5'- или 3'-конца участок содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 866 или от 868 до 1622 или комплементарной ей соответственно; или из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 939 или от 941 до 1622 или комплементарной ей соответственно; указанный участок мутации содержит нуклеотид 867 в последовательности SEQ ID NO: 5 или комплементарной ей; или нуклеотид 940 в последовательности SEQ ID NO: 5 или комплементарной ей; и указанный участок стыка содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 867 или от 867 до 1622 или комплементарной ей, или из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 940 или от 940 до 1622 или комплементарной ей соответственно; или

указанный фланкирующий с 5'- или 3'-конца участок содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 643 или от 645 до 1593 или комплементарной ей соответственно; указанный участок мутации содержит нуклеотид 644 в последовательности SEQ ID NO: 7 или комплементарной ей; и указанный участок стыка содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 644 или от 644 до 1593 или комплементарной ей соответственно; или

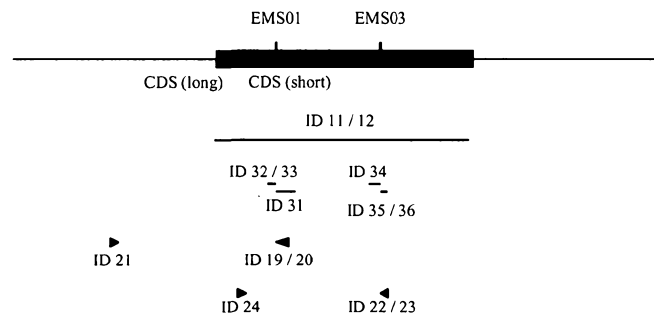
указанный фланкирующий с 5'- или 3'-конца участок содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 898 или от 900 до 1593 или комплементарной ей соответственно; указанный участок мутации содержит нуклеотид 899 в последовательности SEQ ID NO: 7 или комплементарной ей; и указанный участок стыка содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 899 или от 899 до 1593 или комплементарной ей соответственно.

15. Способ идентификации мутантного аллеля IND по п.1 или 2 в биологическом образце, включающий определение наличия мутированного участка ДНК мутантного аллеля IND в нуклеиновой кислоте, присутствующей в биологическом образце, где способ дополнительно включает проведение на биологическом образце анализа полимеразной цепной реакции или гибридизации, с использованием набора, содержащего набор праймеров или зондов, описанных в любом из пп.8-10, или зонда, описанного в п.13 или 14.



**BnIND-A1** (1622 bps)

Фиг. 1



**BnIND-C1** (1593 bps)

Фиг. 2

