

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036845**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.12.28**

(21) Номер заявки  
**201792350**

(22) Дата подачи заявки  
**2009.07.09**

(51) Int. Cl. *C12Q 1/6806* (2018.01)  
*C12Q 1/6809* (2018.01)  
*C07H 19/00* (2006.01)  
*C07H 21/00* (2006.01)

---

### (54) СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЧАСТИЧНО НОКАУТИРОВАННОГО МУТАНТНОГО АЛЛЕЛЯ IND ГЕНА В БИОЛОГИЧЕСКОМ ОБРАЗЦЕ И НАБОР ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ЭТОГО СПОСОБА

---

(31) **61/135,230; 08075648.9**

(32) **2008.07.17; 2008.07.18**

(33) **US; EP**

(43) **2018.03.30**

(62) **201170208; 2009.07.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БАСФ АГРИКАЛЧЕРАЛ  
СОЛЮШНС СИД ЮС ЛЛК (US)**

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

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

(56) RU-C1-2180922  
RU-C1-2294965  
DATABASE, GenBank: CQ975798.1,  
19.01.2005  
DATABASE, GenBank: CQ975797.1,  
19.01.2005  
IRINA NAZARENKO et al. Multiplex  
quantitative PCR using self-quenched primers labeled  
with a single fluorophore. Nucleic Acids Research,  
2002, Vol. 30, no. 9 e37, pp. 1-7

(57) Это изобретение относится к сельскохозяйственным растениям, у которых изменены свойства растрескивания плода. Более конкретно, оно относится к способу идентификации частично нокаутированного мутантного аллеля IND гена в биологическом образце и к набору для осуществления этого способа. Указанный мутантный аллель обеспечивает уменьшение осыпания семян или замедляет осыпание семян до окончания сбора урожая при сохранении в то же самое время агрономически релевантной обмолачиваемости стручков и для увеличения урожайности.

**B1****036845****036845****B1**

### Область изобретения

Это изобретение относится к области сельского хозяйства, более конкретно, к применению способов молекулярной биологии для изменения растений с высвобождением семян растрескиванием, в частности семейства Brassicaceae, в частности видов Brassica, и/или ускорения размножения таких растений с высвобождением семян растрескиванием. Более конкретно, изобретение относится к улучшенным способам и средствам для уменьшения осыпания семян или задержки осыпания семян до окончания сбора урожая у таких растений, как растения Brassicaceae, в частности растения Brassicaceae, выращенные для получения семян, при поддержании в то же самое время агрономически релевантной обмолачиваемости стручков.

Представлены также способы идентификации молекулярных маркеров, ассоциированных с уменьшенным или замедленным осыпанием семян в популяции растений с высвобождением семян растрескиванием. Представлены также способы и средства для увеличения урожая, в частности урожая зерна и семян. Фенотип с увеличенной урожайностью может являться отдельным от фенотипа с уменьшенным или замедленным осыпанием семян.

### Предпосылки изобретения

Длинные стручки или стручки из растений Brassica высвобождают свои семена посредством процесса, называемого растрескиванием плода. Длинный стручок состоит из двух плодолистиков, соединенных по краям. Бороздка между краями формирует толстую перегородку, называемую рамкой. При приближении созревания стручка две створки постепенно отделяются от рамки по определенным линиям слабости стручка, в конечном счете приводя к осыпанию семян, которые были присоединены к рамке. Зона растрескивания определяет точное положение разъединения.

Выпадение семян (обозначаемое также как "осыпание семян" или "растрескивание стручков") у зрелых стручков до или во время сбора урожая представляет собой общее явление у сельскохозяйственных культур, у которых развиваются сухие растрескивающиеся плоды. Осыпание семян до созревания приводит к пониженному сбору семян, что представляет собой проблему в случае сельскохозяйственных культур, которые выращивают преимущественно ради семян, таких как масличные растения Brassica, в частности масличный рапс. Другой проблемой, связанной с осыпанием семян до созревания, является увеличение роста самосева в последующем сельскохозяйственном году. У масличного рапса связанные с растрескиванием стручков потери урожая составляют в среднем 20% (Child et al., 1998, J. Exp. Bot. 49: 829-838), но могут достигать вплоть до 50%, в зависимости от погодных условий (MacLeod, 1981, Harvesting in Oilseed Rape, pp. 107-120, Cambridge Agricultural Publishing, Cambridge).

Современные коммерческие сорта масличного рапса являются необычайно чувствительными к растрескиванию. Существуют небольшие различия по устойчивости к растрескиванию в рамках существующих программ селекционной работы *B.napus*, однако, устойчивые линии обнаружены среди диплоидных родителей *B.napus* (*B.oleracea* и *B.rapa*), также как среди других членов рода Brassica, а именно, *B.juncea*, *B.carinata* и *B.nigra*. Kadkol et al. (1986, Aust. J. Botany 34 (5): 595-601) опубликовали увеличенную устойчивость к растрескиванию в конкретных образцах *B.campestris*, ассоциированную с отсутствием отделительного слоя в области присоединения створок длинного стручка к рамке. Prakash и Chopra (1988, Plant breeding 101: 167-168) описывают интрогрессию устойчивости к растрескиванию в Brassica napus из Brassica juncea посредством негомологичной рекомбинации. Spence et al. (1996, J. of Microscopy 181: 195-203) описывают, что для некоторых линий Brassica juncea показали уменьшенную тенденцию к растрескиванию по сравнению с линиями Brassica napus. Morgan et al., 1998 (Fields Crop Research 58, 153-165) описывают генетические варианты для устойчивости к растрескиванию стручков среди линий масличного рапса, полученных из синтетического *B.napus*, и заключают, что линии, которым необходимо намного больше энергии для раскрытия стручков, по-видимому, обладают повышенным образованием сосудов в зоне растрескивания и обладают уменьшенной деградацией клеточной стенки в зоне растрескивания. Кроме того, они обнаружили значимую отрицательную корреляцию между длиной носика стручка и силой, необходимой, чтобы вызвать растрескивание стручков. Child и Huttly (1999, Proc 10th Int. Rapeseed Congress) описывают варианты созревания стручков в *B.napus* с вызванными облучением мутациями и в популяции его родительского культивара, Jet Neuf, где для наиболее устойчивых растений дикого типа и мутантных растений показано много случаев лигнификации групп клеток на всем протяжении зоны растрескивания и где для мутантов описаны линии сосудов, расположенные близко к внутренней кромке зоны растрескивания, что помогает сохранить створки. Кроме того, Child et al. (2003, J. Exp. Botany 54 (389): 1919-1930) описывают ассоциацию между увеличенной устойчивостью к растрескиванию стручков и изменениями в структуре сосудов в стручках ресинтезированной линии Brassica napus. Однако общепринятые способы селекции являлись безуспешными для придания устойчивости к растрескиванию культиварам рапса без помех для других желательных признаков, таких как раннее цветение, созревание и устойчивость к черной ножке (Prakash and Chopra, 1990, Genetical Research 56: 1-2).

Несколько генов, которые стимулируют или ингибируют раскрытие стручков, идентифицировали в *Arabidopsis thaliana* посредством анализа мутаций. Комбинированные мутации как в SHATTERPROOF1 (SHP1; первоначально обозначенный AGL1), так и в SHATTERPROOF 2 (SHP2; первоначально обозначенный AGL5), приводит к нерастрескивающимся длинным стручкам (т.е. длинным стручкам, которые

остаются закрытыми после созревания у *Arabidopsis thaliana*) (Liljegen et al., 2000, Nature 404, 766-770). Подобным образом, мутации в гене INDEHISCENT (обозначенном как IND1) в *Arabidopsis thaliana* (Liljegen et al., 2004, Cell 116: 843-853; Публикация PCT WO 01/79517), также как в ALCATRAZ (обозначенном как ALC; Rajani et al. 2001, Current Biology 11, 1914-1922), мешающие раскрытию стручков, приводят к устойчивости к растрескиванию стручков. Конститутивная экспрессия FRUITFUL (FUL), репрессора SHP и IND, в *Arabidopsis thaliana* также приводит к нерастрескивающимся длинным стручкам (Ferrandiz et al., 2000, Science, 289, 436-438). Считают, что эти факторы транскрипции формируют нелинейную транскрипционную сеть, контролирующую идентичность границ створок и растрескивание стручков. Кроме того, Liljegen et al. (2004, Cell 116: 843-853) описывают, что IND, ген атипичного белка спираль-петля-спираль (bHLH), управляет дифференцировкой границы створки на отдельные и лигнифицированные слои у *Arabidopsis thaliana*. Слой лигнифицированных клеток, соседний с отделительным слоем, вместе со слоем эндокарпия b (отдельный слой лигнифицированных клеток в каждой створке) приводит к напряжению, подобному напряжению пружины, в высыхающем плоде, которое вносит вклад в его открытие. Для лигнификации слоя эндокарпия b створки необходима активность IND, SHP, ALC и FUL, MADS-домени фактора транскрипции, который экспрессируется в створках (Liljegen et al., 2004, выше; Mandel and Yanofsky, 1995, Plant Cell 7, 1763-1771). Обнаружено, что FUL и REPLUMLESS (RPL), гомеодомени фактор транскрипции, который экспрессируется в рамке (Roeder et al., 2003, Curr. Biol. 13, 1630-1635), устанавливают границы генов, придающих идентичность границам створок (Gu et al., 1998, Development 125, 1509-1517; Ferrandiz et al., 2000, Science, 289, 436-438; Roeder et al., 2003, выше). Наконец, идентифицировали, что FILAMENTOUS FLOWER (FIL) и YABBY3 (YAB3), два фактора транскрипции YABBY-семейства (Sawa et al., 1999, Genes Dev 13, 1079-1088; Siegfried et al., 1999, Development 126, 4117-4128), и JAGGED (JAG), фактор транскрипции с цинковыми пальцами C2H2 (Dinneny et al., 2004, Development 131, 1101-1110; Ohno et al., 2004, Development 131, 1111-1122), вносят резервный вклад в правильное развитие створки и границ створки посредством стимуляции экспрессии FUL и SHP зависимым от области образом (Dinneny et al., 2005, Development 132, 4687-4696). Идентифицированы также гены для ряда гидролитических ферментов, таких как эндополигалактуроназы, которые играют роль, во время растрескивания стручка, в запрограммированном разрушении зоны растрескивания в стручках растений Brassica (см., например, WO 97/13865; Petersen et al., Plant. Mol. Biol., 1996, 31:517-527).

Liljegen et al. (2004, Cell 116: 843-853) описывают пять мутантных аллелей IND *Arabidopsis*. Лигнифицированные клетки в зоне растрескивания либо отсутствуют, либо присутствуют в растениях, содержащих эти мутантные аллели, в зависимости от силы мутаций (сильные мутанты ind не содержат лигнифицированных клеток в области, соответствующие внутренней части границы створки у растений дикого типа), но во всех случаях длинный стручок является нерастрескивающимся. Wu et al. (2006), Planta 224, 971-979) описывают шестой мутантный аллель IND *Arabidopsis*. Растения, содержащие этот мутантный аллель, не обладают лигнифицированными клетками в соединениях границы створки и рамки, содержат меньше клеток в области семи слоев клеток, которые, по-видимому, охватывают общеизвестную зону растрескивания и границу рамки в растениях дикого типа, и обладают неполным цитокинезом в этом слое.

В US 2005/0120417 и US 2007/0006336 описаны идентификация и выделение двух ортологов IND1 из *Brassica napus*.

В WO 99/00503, WO 01/79517 и WO 0159122 описаны понижающая регуляция экспрессии генов ALC, IND, AGL1 и AGL5 *Arabidopsis genes* и их ортологов с использованием способов выключения генов (таких как антисмысловая супрессия или косупрессия) и мутагенеза.

Vancanneyt et al., 2002 (XIII International Conference on Arabidopsis Research, Sevilla, Spain June 28-July 2; 2002) опубликовали, что экспрессия FUL из *A. thaliana* под контролем промотора CaMV 35S в масличном рапсе приводит в результате к ряду трансформантов, устойчивых к растрескиванию стручков. Стручки из таких устойчивых к растрескиванию стручков линий не имеют зоны растрескивания, и открытия стручков можно достичь только случайным растрескиванием створок при приложении значительного давления.

Vancanneyt et al., 2002 (XIII International Conference on Arabidopsis Research, Sevilla, Spain June 28-July 2; 2002) опубликовали также, что выключение гена IND в *Arabidopsis thaliana* с использованием так называемых способов выключения с помощью дцРНК приводит почти к полной устойчивости к растрескиванию стручков. У девяноста восьми процентов трансгенных линий *Arabidopsis* развиваются длинные стручки, которые не открываются по бороздке между створками и которые можно открыть только приложением значительного давления к створкам.

Важно понимать, что в то время как осыпание семян составляет важную проблему в культивировании масличного рапса, которую можно решить разработкой устойчивых к растрескиванию стручков линий, в конечном счете, отделение семян от стручков все еще является необходимым. Обычным агрономическим приемом для достижения этого является обмолачивание стручков уборочным комбайном. Обмолачивание стручков уборочным комбайном должно быть полным и должно вызывать минимальное разрушение высвобождаемых таким образом семян. Однако при увеличении прочности стручков более

сильное воздействие, необходимое для их обмолачивания, вызывает неприемлемый уровень разрушения семян. Таким образом, стручки устойчивых к растрескиванию стручков растений Brassicaceae не должны быть настолько прочными, чтобы их нельзя было обмолачивать уборочным комбайном (Bruce et al. 2001, J. Agric. Engng Res. 80, 343-350).

В WO 2004/113542 описано, что умеренное выключение генов с помощью дцРНК в случае генов, вовлеченных в развитие зоны растрескивания и границ створок стручков у растений Brassicaceae, позволяет выделить трансгенных линий с увеличенной устойчивостью к растрескиванию стручков и уменьшенным осыпанием семян, стручки которых, однако, все еще можно открыть по зоне растрескивания посредством приложения ограниченных физических сил.

В WO 09/068313 (притязющей на приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052) описаны растения Brassica, содержащие по меньшей мере два гена IND, в частности растения Brassica napus, отличающиеся тем, что они содержат три полностью нокаутированных мутантных аллеля IND в геноме и что устойчивость растений к растрескиванию стручков значительно увеличена по сравнению с устойчивостью к растрескиванию стручков растений, не содержащих мутантных аллели IND, но что растение, предпочтительно, сохраняет агрономически релевантную обмолачиваемость стручков.

Изобретения, описанные в настоящем документе ниже в различных вариантах осуществления, приемах и пунктах формулы изобретения, кроме того, относятся к улучшенным способам и средствам для модуляции свойств растрескивания у растений с высвобождением семян растрескиванием. Более конкретно, настоящее изобретение относится к дополнительным улучшенным способам и средствам для уменьшения осыпания семян или задержки осыпания семян до окончания сбора урожая у растений, таких как растения Brassicaceae, в частности растения Brassicaceae, выращенные для получения семян, при сохранении в то же самое время агрономически релевантной обмолачиваемости стручков. В частности, настоящая заявка относится к растениям Brassica, содержащим по меньшей мере два гена IND, в частности, к растениям Brassica napus, отличающимся тем, что они содержат два частично нокаутированных мутантных аллеля IND в геноме или два частично и два полностью нокаутированных мутантных аллеля IND и что устойчивость к растрескиванию стручков растений значительно увеличена по сравнению с устойчивостью к растрескиванию стручков растений, не содержащего мутантных аллели IND, но что растение предпочтительно сохраняет агрономически релевантную обмолачиваемость стручков.

Представлены также способы и средства для увеличения урожая, в частности урожая зерна и семян. Фенотип увеличенной урожайности может являться отдельным от фенотипа с уменьшенным или задержанным осыпанием семян.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

Авторы изобретения обнаружили, что растения Brassica napus с фенотипом растрескивания стручков, сходным с растениями Brassica, описанными в WO 09/068313 (притязющей на приоритет патентной заявки EP 07023052), т.е. сочетающие увеличенную устойчивость к растрескиванию стручков с агрономически релевантной обмолачиваемостью стручков, можно получать также комбинацией двух частично нокаутированных мутантных аллелей IND с двумя полностью нокаутированными мутантными аллелями IND или без них вместо комбинации трех полностью нокаутированных мутантных аллелей IND.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к растению Brassica, содержащему по меньшей мере два гена IND, или к его клетке, части, семени или потомству, отличающимся тем, что они содержат по меньшей мере два частично нокаутированных мутантных аллеля IND в геноме. В одном варианте осуществления гены IND представляют собой гены IND-A1 или IND-C1. В другом варианте осуществления гены IND содержат молекулу нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из: молекулы нуклеиновой кислоты, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 от нуклеотида в положении 46 до нуклеотида в положении 633, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 или с SEQ ID NO: 7; и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 от аминокислоты в положении 16 до аминокислоты в положении 21 или с SEQ ID NO: 4. В следующем варианте осуществления частично нокаутированные мутантные аллели IND представляют собой мутантные аллели IND гена IND-C1. В еще одном варианте осуществления частично нокаутированные мутантные аллели IND выбраны из группы, состоящей из ind-a1-EMS06, ind-a1-EMS09, ind-a1-EMS13, ind-c1-EMS04, ind-c1-EMS05 и ind-c1-EMS09. В дополнительном варианте осуществления растение дополнительно содержит по меньшей мере один полностью нокаутированный мутантный аллель IND в геноме. В еще одном варианте осуществления полностью нокаутированный мутантный аллель IND представляет собой мутантный аллель IND гена IND-C1. В другом варианте осуществления полностью нокаутированный мутантный аллель IND выбран из группы, состоящей из ind-a1-EMS01, ind-a1-EMS05, ind-c1-EKS01 и ind-c1-EKS03. В другом варианте осуществления растение является гомозиготным по частично и/или по полностью нокаутированному мутантному аллелю IND. В еще одном варианте осуществления растение продуцирует значительно уменьшенное количество функционального белка IND по сравнению с количеством функционального белка IND, продуцируемого соответствующим растением, не содержащим мутантных аллелей IND. В следующем варианте осуществления осыпание семян растения является значительно уменьшенным или замедленным по сравнению с осыпа-

нием семян соответствующего растения, не содержащего мутантных аллелей IND. В еще одном варианте осуществления растение сохраняет агрономически релевантную обмолачиваемость стручков. В другом варианте осуществления растение представляет собой растение из сельскохозяйственного вида *Brassica*, предпочтительно *Brassica napus*, *Brassica juncea*, *Brassica carinata*, *Brassica rapa* или *Brassica oleracea*. В еще одном варианте осуществления растение представляет собой растение из масличного вида *Brassica*, предпочтительно *Brassica napus*, *Brassica juncea* или *Brassica rapa*.

В другом аспекте изобретение относится к растению или к его клетке, части, семени или потомству, содержащим по меньшей мере один частично нокаутированный мутантный аллель гена IND в геноме, где ген IND содержит молекулу нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 от нуклеотида в положении 46 до нуклеотида в положении 633, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 7; и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 от аминокислоты в положении 16 до аминокислоты в положении 21 или SEQ ID NO: 4. В одном варианте осуществления частично нокаутированный мутантный аллель IND выбран из группы, состоящей из ind-a1-EMS06, ind-a1-EMS09, ind-a1-EMS13, ind-c1-EMS04, ind-c1-EMS06 и ind-c1-EMS09. В другом варианте осуществления мутантный аллель IND получен из растения вида *Brassica*. В другом варианте осуществления растение представляет собой растение из вида *Brassica*.

Следующий аспект относится к стручку с семенами, который можно получить от растений по изобретению.

Следующий аспект относится к частично нокаутированному мутантному аллелю гена IND, где ген IND содержит молекулу нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 от нуклеотида в положении 46 до нуклеотида в положении 633, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7; и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 от аминокислоты в положении 16 до аминокислоты в положении 21 или SEQ ID NO: 4. В одном варианте осуществления мутантный аллель выбран из группы, состоящей из ind-a1-EMS06, ind-a1-EMS09, ind-a1-EMS13, ind-c1-EMS04, ind-c1-EMS05 и ind-c1-EMS09. В другом варианте осуществления мутантный аллель получен из растения вида *Brassica*, предпочтительно из сельскохозяйственного вида *Brassica* или масличного вида *Brassica*. Еще один аспект относится к мутантному белку IND, кодируемому мутантными аллелями IND по изобретению.

Дополнительный аспект относится к способу идентификации мутантного аллеля IND по изобретению в биологическом образце, включающий в себя определение присутствия конкретной области мутантного IND в нуклеиновой кислоте, присутствующей в биологическом образце. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя подвергание биологического образца анализу полимеразной цепной реакцией с использованием набора по меньшей мере из двух праймеров, где указанный набор выбран из группы, состоящей из набора праймеров, где один из указанных праймеров специфически узнает 5'-фланкирующую область мутантного аллеля IND, а второй из указанных праймеров специфически узнает 3'-фланкирующую область мутантного аллеля IND, соответственно; набора праймеров, где один из указанных праймеров специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область мутантного аллеля IND, а второй из указанных праймеров специфически узнает область мутации мутантного аллеля IND; и набора праймеров, где один из указанных праймеров специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область мутантного аллеля IND, а второй из указанных праймеров специфически узнает область соединения 3'- или 5'-фланкирующей области и области мутации мутантного аллеля IND соответственно. В другом варианте осуществления праймер, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область мутантного аллеля IND, состоит из нуклеотидной последовательности из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранных из 5'- или 3'-фланкирующей последовательности мутантного аллеля IND или из комплементарной ей последовательности, соответственно, или праймер, который специфически узнает область мутации мутантного аллеля IND, состоит из нуклеотидной последовательности из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранных из мутантной последовательности мутантного аллеля IND или из комплементарной ей последовательности, или праймер, который специфически узнает область соединения 5'- или 3'-фланкирующей области и области мутации мутантного аллеля IND, состоит из нуклеотидной последовательности из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранных из последовательности, перекрывающей область соединения 5'- или 3'-фланкирующей области и области мутации мутантного аллеля IND, или из комплементарной ей последовательности, где указанные 17-200 последовательных нуклеотидов не происходят исключительно либо из мутантной, либо из фланкирующей последовательностей. В дополнительном варианте осуществления, праймер, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область мутантного аллеля IND, содержит на самом 3'-конце нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 17 последовательных нуклеотидов, выбранных из 5'- или 3'-фланкирующей последовательности мутантного аллеля IND или из комплементарной ей последовательности, соответственно, или праймер, который специфически узнает область мутации мутантного аллеля

[illegible]

ной ей последовательности, соответственно; указанная область мутации обладает нуклеотидной последовательностью нуклеотида 1036 из SEQ ID NO: 5 или из комплементарной ей последовательности; и указанная область соединения содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до 1036 или от 1036 до 1622 или из комплементарной ей последовательности, соответственно; или 5'-или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 902 или от 904 до 1593 или из комплементарной ей последовательности, соответственно; указанная область мутации обладает нуклеотидной последовательностью нуклеотида 903 из SEQ ID NO: 7 или из комплементарной ей последовательности; и указанная область соединения содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 903 или от 903 до 1593 или из комплементарной ей последовательности, соответственно; или 5'-или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 910 или от 912 до 1593 или из комплементарной ей последовательности, соответственно; указанная область мутации обладает нуклеотидной последовательностью нуклеотида 911 из SEQ ID NO: 7 или из комплементарной ей последовательности; и указанная область соединения содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 911 или от 911 до 1593 или из комплементарной ей последовательности, соответственно; или 5'-или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 919 или от 921 до 1593 или из комплементарной ей последовательности, соответственно; указанная область мутации обладает нуклеотидной последовательностью нуклеотида 920 из SEQ ID NO: 7 или из комплементарной ей последовательности; и указанная область соединения содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 920 или от 920 до 1593 или из комплементарной ей последовательности, соответственно. В другом конкретном варианте осуществления набор зондов выбран из группы, состоящей из набора зондов, содержащего один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 11, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 12; набора зондов, содержащего один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 14, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 15; набора зондов, содержащего один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 17, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 18; набора зондов, содержащего один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 20, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 21; набора зондов, содержащего один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 23, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 24; и набора зондов, содержащего один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 26, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 27.

Другой аспект относится к способу определения статуса зиготности мутантного аллеля IND по изобретению в растении или в его клетке, части, семени или потомстве, включающий в себя определение присутствия специфической области мутантного и/или соответствующего дикого типа IND в геномной ДНК указанного растения или его клетки, части, семени или потомства. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя подвергание геномной ДНК указанного растения или его клетки, части, семени или потомства анализу полимеразной цепной реакцией с использованием набора по меньшей мере из двух или по меньшей мере из трех праймеров, где по меньшей мере два из указанных праймеров специфически узнают аллель IND дикого типа, где указанные по меньшей мере два праймера выбраны из группы, состоящей из первого праймера, который специфически узнает 5'-или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа IND, и второго праймера, который специфически узнает 3'- или 5'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, соответственно; первого праймера, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, и второго праймера, который специфически узнает область мутации аллеля IND дикого типа; и первого праймера, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, и второго праймера, который специфически узнает область соединения 3'- или 5'-фланкирующей области и области мутации аллеля IND дикого типа, соответственно; и где по меньшей мере два из указанных праймеров специфически узнают мутантный аллель IND, где указанные по меньшей мере два праймера выбраны из группы, состоящей из: первого праймера, который специфически узнает 5'-или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, и второго праймера, который специфически узнает 3'- или 5'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, соответственно; первого праймера, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, и третьего праймера, который специфически узнает область мутации мутантного аллеля IND; и первого праймера, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, и третьего праймера, который специфически узнает область соединения 3'- или 5'-фланкирующей области и области мутации мутантного аллеля IND, соответственно. В следующем варианте осуществления праймер, который специфически узнает 5'-или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, состоит из нуклеотидной последовательности из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранных из 5'- или 3'-фланкирующей последовательности аллеля IND мутантного и дикого типа или из комплементарной ей последовательности, соответственно; или праймер, который специфически узнает область мутации аллеля IND мутантного или дикого типа, состоит из нуклеотидной последовательности из 17-200 последовательных нуклеотидов,









следовательности, соответственно; и указанная область соединения мутантного аллеля IND содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 910 с последующим а или а с последующей нуклеотидной последовательностью из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 912 до 1593 или из комплементарной ей последовательности, соответственно; или 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 919 или от 921 до 1593 или из комплементарной ей последовательности, соответственно; указанная область мутации аллеля IND дикого типа обладает нуклеотидной последовательностью нуклеотида 920 из SEQ ID NO: 7 или из комплементарной ей последовательности; указанная область мутации мутантного аллеля IND обладает последовательностью t или комплементарной ей последовательностью; и указанная область соединения аллеля IND дикого типа содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 920 или 920 до 1593 или из комплементарной ей последовательности, соответственно; и указанная область соединения мутантного аллеля IND содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до 919 с последующим t или t с последующей нуклеотидной последовательностью из SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 921 до 1593 или из комплементарной ей последовательности, соответственно. В конкретном варианте осуществления набор по меньшей мере из трех специфических зондов выбран из группы, состоящей из: набора зондов, содержащего один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 11, один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 12, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 13; набора зондов, содержащего один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 14, один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 15, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 16; набора зондов, содержащего один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 17, один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 18, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 19; набора зондов, содержащего один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 20, один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 21, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 22; набора зондов, содержащего один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 23, один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 24, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 25; и набора зондов, содержащего один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 26, один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 27, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 28.

Представлены также наборы для идентификации мутантного аллеля IND по изобретению в биологическом образце, и наборы для определения статуса зиготности мутантного аллеля IND по изобретению в растении или его клетке, части, семени или потомстве, содержащие праймеры или зонды, как описано выше, также как и способы комбинации мутантных аллелей IND по изобретению в одном растении, способы переноса мутантных аллелей IND по изобретению от одного растения другому растению, и способы получения (гибридного) растения или семени по изобретению.

В другом варианте осуществления изобретения мутантные аллели IND по изобретению применяют для увеличения урожая собранных семян или зерна из растений Brassica. Увеличение урожая может являться последствием уменьшения или замедления осыпания семян, но может также являться независимым от уменьшенного или замедленного осыпания семян. В частности, представлены растения Brassica, содержащие по меньшей мере два гена IND, или их клетки, части, семена или потомство, отличающиеся тем, что эти растения содержат в геноме два мутантных гомозиготных аллеля IND, как описано в настоящем документе.

### Общие определения

"Увеличение устойчивости к растрескиванию стручков" и "уменьшение осыпания семян", как применяют в настоящем документе, относятся к тенденции к уменьшенному осыпанию семян и/или задержке момента осыпания семян, в частности, до окончания сбора урожая, растений Brassica, плоды которых в норме созревают не синхронно, а последовательно, так что некоторые стручки распахиваются и осыпают свои семена до или во время сбора урожая. Уровень устойчивости к растрескиванию стручков положительно коррелирует со следующим и его можно измерить, например, посредством определения следующего: силы, необходимой для разламывания стручков, в "тесте разделения при растяжении" (Davies and Bruce, 1997, J. Mat. Sci. 32: 5895-5899; Morgan et al., 1998, Fields Crop Research 58, 153-165), числа интактных стручков, остающихся, например, через 20 с ("IP20"; Morgan et al., 1998, выше), 9,7 или 17 с (Bruce et al., 2002, Biosystems Eng. 81(2): 179-184) в "тесте испытания на случайную ударную нагрузку", времени полужизни образца стручков (далее в настоящем документе обозначаемого также как "LD50") в тесте испытания на случайную ударную нагрузку, т.е. времени обработки, необходимого, чтобы вызвать открытие 50% стручков в тестируемых образцах стручков, и "показателя растрескивания в полевых условиях" (Morgan et al., 1998, выше). Тесты испытания на случайную ударную нагрузку (RIT) и алгоритмы для определения времени полужизни образца стручков в таких RIT описаны в Bruce et al., 2002 (выше), Morgan et al., 1998 (выше) и в примерах ниже. Содержание обеих публикаций, таким образом, приведено в качестве ссылки. Кратко, образец интактных зрелых стручков помещают в закрытый барабан вместе со стальными шарами и затем барабан энергично встряхивают в течение увеличивающихся периодов времени (например, 10, 20, 40, 80 с). После каждого периода барабан открывают и подсчитывают число рас-

колотых и разрушенных стручков. Наиболее точное определение уровня устойчивости к растрескиванию для каждой линии рассчитывают подстановкой в линейную и логистическую кривую всех доступных данных и определением времени, затраченного на раскалывание половины стручков в образце ("время полужизни образца стручков" или "LD50"). Однако важно, что стручки открываются в основном в зоне растрескивания, а не просто размельчаются, как может происходить с нерастрескивающимися стручками.

"Агрономически релевантное увеличение устойчивости к растрескиванию стручков", как применяют в настоящем документе, относится к увеличению устойчивости к растрескиванию стручков у растения, которое приводит к связанным с растрескиванием стручков потерям урожая в полевых условиях (до сбора урожая), ниже потерь, в норме наблюдаемых для этого растения в полевых условиях. В случае масличного рапса опубликовано, что связанные с растрескиванием стручков потери урожая в полевых условиях составляют приблизительно 11% для сезона с хорошими в среднем условиями роста и приблизительно 25% для сезона с плохими в среднем условиями роста. Обнаружена положительная корреляция между этими уровнями потери семян и уровнем потери семян при времени обработки 9,7 и 17 с, соответственно, в тесте испытания на случайную ударную нагрузку, как описано в Bruce et al., 2002 (Biosystems Eng 81(2): 179-184). Альтернативно, для определения, является ли уровень устойчивости к растрескиванию стручков у растения агрономически релевантным, время полужизни образца стручков ("LD50", см. выше) растения можно сравнивать с временем полужизни образца стручков растения, известного как обладающее средним уровнем устойчивости к растрескиванию стручков, такого как, в случае масличного рапса, все доступные в настоящее время сорта масличного рапса.

Как применяют в настоящем документе, "раскрытие стручка или осыпание семян" или "растрескивание плода или стручка" относится к процессу, который имеет место в плоде после созревания семян, посредством чего створки отделяются от центральной перегородки, высвобождая семена. Область разлома (т.е. "зона растрескивания") проходит по всей длине плода между створками и рамкой (внешней перегородкой). При созревании "зона растрескивания" представляет собой в основном не лигнифицированный слой клеток между областью лигнифицированных клеток в створке и рамке. Растрескивание происходит из-за сочетания ослабления клеточной стенки в зоне растрескивания и напряжений, созданных различными механическими свойствами высыхающих клеток в стручке.

"Плод" Brassica, как применяют в настоящем документе, относится к органу растения Brassica, который развивается из гинецея, составленного из сросшихся плодолистиков, которые, после оплодотворения, растут, чтобы стать "стручком (с семенами)" или "длинным стручком", содержащим развивающиеся семена. "Стручок (с семенами)" или "длинный стручок" Brassica состоит из плодовой оболочки (плодолистика), окружающей два гнезда, разделенные перегородкой. "Зоны растрескивания" развиваются на границах плодолистика, прилегающих к перегородке, и проходят по длине длинного стручка. Клетки зоны растрескивания в конечном счете начинают деградировать, и это ослабляет контакт между стенками плодолистика или створками и перегородкой. Потеря связи клеток ограничена клетками зоны растрескивания и является результатом разрушения межклеточной пластинки (Meakin and Roberts, 1990, J. Exp. Bot. 41, 995-1011).

"Зоны растрескивания", как применяют в настоящем документе, относится к слоям простых, паренхиматозных клеток, содержащихся в бороздках, расположенных на обеих сторонах двустворчатых стручков растений, в частности растений Brassica. Зоны растрескивания расположены между краем створки стручка и центральной рамкой, которая содержит основной сосудистый пучок до цветоножки или плодоножки. Разделение клеток в зоне растрескивания имеет место в ходе старения стручка и является полным на время достижения стручками полной зрелости (Meakin and Roberts, 1990, выше). Может иметь место разделение створок. Зона растрескивания содержит линии сосудов, которые проходят от стенки стручка до плодоножки (цветоножки) и рамки. Процесс растрескивания стручков имеет место только после того, как внешняя сила разрывает тонкие нити сосудов, позволяя створкам разделяться и семенам падать на землю. Это происходит во время нарушения растительного покрова, например, при контакте с комбайном во время сбора урожая. Ткань сосудов содержит утолщенные, лигнифицированные клетки, которые формируют колленхиматозные группы клеток, обнаруженные рядом с проводящими клетками (Meakin and Roberts, 1990, выше). Это придает жесткость ткани и, предположительно, некоторую устойчивость к растрескиванию.

Как применяют в настоящем документе, "агрономически релевантная обмолачиваемость" относится к устойчивости стручка, в частности стручка масличного рапса, к открытию по зоне растрескивания стручка с одновременным высвобождением семян, при приложении физических сил, которые позволяют полное открытие стручков при предотвращении разрушения семян, какие используют, например, в уборочном комбайне. Обнаружена положительная корреляция между временем полужизни образца стручков ("LD50") в тесте испытания на случайную ударную нагрузку и их обмолачиваемостью. Периоды времени полужизни образца стручков масличного рапса, как определено по RIT, проведенному, как описано в примерах, которые соответствуют агрономически релевантной обмолачиваемости, не должны превышать 80 с. Типичные значения времени полужизни образцов для контрольных линий коммерчески доступных сортов масличного рапса составляют приблизительно 10 с. Таким образом, линии со значительно увеличенной устойчивостью к растрескиванию стручков с агрономически релевантной обмолачиваемостью

стью обладают временем полужизни образца стручков в RIT между приблизительно 10 и приблизительно 80 с, между приблизительно 10 и приблизительно 70 с, между приблизительно 15 и приблизительно 70 с, между приблизительно 10 и приблизительно 60 с, между приблизительно 10 и приблизительно 50 с, между приблизительно 20 и приблизительно 60 с, между приблизительно 20 и приблизительно 50 с, между приблизительно 40 и приблизительно 60 с, приблизительно 57 с.

"Растение с высвобождением семян растрескиванием" обозначает растение, образующее сухой растрескивающийся плод, обладающий стенками плода, которые открываются, чтобы позволять выход семян, содержащихся в нем. Растрескивающиеся плоды, как правило, содержат несколько семян и включают в себя плоды, известные, например, как бобы, капсулы и стручки.

"Сельскохозяйственное растение" относится к видам растений, культивируемым в качестве сельскохозяйственных культур, таких как *Brassica napus* (AACC, 2n=38), *Brassica juncea* (AABB, 2n=36), *Brassica carinata* (BBCC, 2n=34), *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*) (AA., 2n=20), *Brassica oleracea* (CC, 2n=18) или *Brassica nigra* (BB, 2n=16). Определение не включает сорняки, такие как *Arabidopsis thaliana*.

Термин "последовательность нуклеиновой кислоты" (или молекула нуклеиновой кислоты) относится к молекуле ДНК или РНК в одно- или двухцепочечной форме, в частности ДНК, кодирующей белок или фрагмент белка по изобретению. "Эндогенная последовательность нуклеиновой кислоты" относится к последовательности нуклеиновой кислоты в клетке растения, например эндогенному аллелю гена IND, присутствующей в ядерном геноме клетки *Brassica*. "Выделенную последовательность нуклеиновой кислоты" используют для обозначения последовательности нуклеиновой кислоты, которая больше не находится в ее естественном окружении, например, *in vitro* или в рекомбинантной клетке-хозяине бактерии или растения.

Термин "ген" обозначает последовательность ДНК, содержащую область (транскрибируемую область), которая подвергается транскрипции в молекулу РНК (например, в пре-мРНК, содержащую интронные последовательности, которая затем подвергается сплайсингу до зрелой мРНК, или непосредственно в мРНК без интронных последовательностей) в клетке, функционально связанную с регуляторными областями (например, промотором). Таким образом, ген может содержать несколько функционально связанных последовательностей, таких как промотор, 5'-лидерная последовательность, содержащая, например, последовательности, вовлеченные в инициацию трансляции, кодирующая (белок) область (кДНК или геномной ДНК) и 3'-нетранслируемая последовательность, содержащая, например, участки терминации транскрипции. "Эндогенный ген" используют, чтобы отличать от "чужеродного гена", "трансгена" или "химерного гена", и он относится к гену из растения конкретного рода, вида или сорта растений, который не является введенным в растение посредством трансформации (т.е. он не является "трансгеном"), но который в норме присутствует в растениях этого рода, вида или сорта, или который является введенным в это растение из растений другого рода, вида или сорта растений, в которых он присутствует в норме, посредством обычных способов селекции или посредством соматической гибридизации, например, посредством слияния протопластов. Подобным образом, "эндогенный аллель" гена не является введенным в растение или ткань растения посредством трансформации растения, но является, например, полученным посредством мутагенеза и/или селекции растений или полученным скринингом природных популяций растений.

"Экспрессия гена" или "генная экспрессия" относится к процессу, где область ДНК, функционально связанную с подходящими регуляторными областями, в частности промотором, транскрибируют в молекулу РНК. Затем молекула РНК подвергается дальнейшему процессингу (посредством пост-транскрипционных процессов) внутри клетки, например посредством сплайсинга РНК, и инициации трансляции и трансляции в аминокислотную цепь (белок), и терминации трансляции посредством трансляции стоп-кодонов. Термин "функционально экспрессированный" применяют в настоящем документе, чтобы указать, что продуцируется функциональный белок; термин "не функционально экспрессированный" - чтобы указать, что продуцируется белок со значительно уменьшенной или отсутствующей функциональностью (биологической активностью) или не продуцируется белок (см. далее ниже).

Термин "белок" относится к молекуле, состоящей из цепи аминокислот, независимо от конкретного образа действия, размера, 3-мерной структуры или происхождения. "Фрагмент" или "часть" белка IND можно, таким образом, еще обозначать как "белок". "Выделенный белок" используют для обозначения белка, который больше не находится в его естественном окружении, например, *in vitro* или в рекомбинантной клетке-хозяине бактерии или растения. "Аминокислоты" являются главными составляющими элементами белков и ферментов. Они включаются в белки посредством транспортной РНК в соответствии с генетическим кодом, в то время как матричную РНК декодируют рибосомы. Во время и после конечной сборки белка аминокислотный состав диктует пространственные и биохимические свойства белка или фермента. Аминокислотный остов определяет первичную последовательность белка, но природа боковых цепей определяет свойства белка. "Сходные аминокислоты", как применяют в настоящем документе, относится к аминокислотам, обладающим сходными боковыми цепями аминокислот, т.е. аминокислотам, обладающим полярными, неполярными или практически нейтральными боковыми цепями. "Несходные аминокислоты", как применяют в настоящем документе, относится к аминокислотам, обладающим различными боковыми цепями аминокислот, например аминокислота с полярной боковой це-

пью является не сходной с аминокислотой с неполярной боковой цепью. Полярные боковые цепи, как правило, проявляют тенденцию присутствовать на поверхности белка, где они могут взаимодействовать с водным окружением, обнаруженным в клетках ("гидрофильные" аминокислоты). С другой стороны, "неполярные" аминокислоты проявляют тенденцию находиться в центре белка, где они могут взаимодействовать со сходными неполярными соседями ("гидрофобные" аминокислоты). Примерами аминокислот, обладающих полярными боковыми цепями, являются аргинин, аспарагин, аспартат, цистеин, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин (все гидрофильные, за исключением цистеина, который является гидрофобным). Примерами аминокислот, обладающих неполярными боковыми цепями, являются аланин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин и триптофан (все гидрофобные, за исключением глицина, который является нейтральным).

Термин "фактор транскрипции" используют для обозначения белка, состоящего по меньшей мере из двух отдельных доменов -ДНК-связывающего домена и домена активации или репрессии - они действуют вместе для регуляции скорости инициации транскрипции с промоторов генов-мишеней (Ptashne, 1988, Nature 335, 683-689). Термин "фактор транскрипции с основным доменом спираль-петля-спираль (bHLH)" используют для обозначения фактора транскрипции, содержащего, помимо 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, являются важными для регуляции экспрессии гена, которые могут являться 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 посредством остатков в основной области, в то время как домен спираль-петля-спираль стимулирует димеризацию, позволяя членам семейства формировать гетеро- или гомодимеры (Murre et al., 1989, Cell 56, 777-783).

Термин "ген IND" в настоящем документе обозначает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок INDEHISCENT (IND), который представляет собой фактор транскрипции с основным доменом спираль-петля-спираль (bHLH), необходимый для разбрасывания семян (Liljegren et al., 2004, Cell 116: 843-853).

Как применяют в настоящем документе, термин "аллель(аллели)" обозначает любую из одной или нескольких альтернативных форм гена в конкретном локусе. В диплоидной (или амфидиплоидной) клетке организма, аллели данного гена локализованы в конкретном положении или локусе(локусах) на хромосоме. Один аллель присутствует на каждой хромосоме из пары гомологичных хромосом.

Как применяют в настоящем документе, термин "гомологичные хромосомы" обозначает хромосомы, которые содержат информацию для одних и тех же биологических признаков и содержат одни и те же гены в одних и тех же локусах, но, возможно, различные аллели этих генов. Гомологичные хромосомы представляют собой хромосомы, спаривающиеся во время мейоза. "Негомологичные хромосомы", представляющие все биологические признаки организма, формируют набор, и число наборов в клетке называют пloidией. Диплоидные организмы содержат два набора негомологичных хромосом, где каждая гомологичная хромосома наследуется от разного родителя. У амфидиплоидного вида существует, по существу, два набора диплоидных геномов, на основании чего хромосомы двух геномов обозначают как "гомеологичные хромосомы" (и сходным образом, локусы или гены двух геномов обозначают как гомеологичные локусы или гены). Диплоидный или амфидиплоидный вид растений может содержать большое число различных аллелей в конкретном локусе.

Как применяют в настоящем документе, термин "гетерозиготный" обозначает генетическое состояние, когда два различных аллеля находятся в конкретном локусе, но расположены отдельно на соответствующих парах гомологичных хромосом в клетке. В противоположность этому, как применяют в настоящем документе, термин "гомозиготный" обозначает генетическое состояние, когда два идентичных аллеля находятся в конкретном локусе, но расположены отдельно на соответствующих парах гомологичных хромосом в клетке.

Как применяют в настоящем документе, термин "локус(ы)" обозначает конкретное место или места или участок на хромосоме, где, например, обнаружен ген или генетический маркер. Например, "локус IND-A1" относится к положению на хромосоме генома А, где можно обнаружить ген IND-A1 (и два аллеля IND-A1), в то время как "локус IND-C1" относится к положению на хромосоме генома С, где можно обнаружить ген IND-C1 (и два аллеля IND-C1).

Во всех случаях, когда сделана ссылка на "растение" или "растения" по изобретению, понятно, что в нее включены также части растения (клетки, ткани или органы, стручки с семенами, семена, отделенные части, такие как корни, листья, цветы, пыльца и т.д.), потомство растений, сохраняющее отличительные признаки родителей (особенно свойства растрескивания плода), такое как семя, полученное посредством самовоспроизводства или скрещивания, например, гибридное семя (полученное скрещиванием двух родительских линий), гибридные растения и части растений, полученные из них, если нет иных указаний.

"Молекулярный анализ" (или тест) обозначает в настоящем документе анализ, который показывает (непосредственно или опосредованно) присутствие или отсутствие одного или нескольких конкретных аллелей IND в одном или обоих локусах IND (например в одном или обоих из локусов IND-A1 или IND-C1). В одном варианте осуществления он позволяет определить, является ли конкретный аллель IND (дикого

типа или мутантный) гомозиготным или гетерозиготным в локусе в любом отдельном растении.

"Дикий тип" (написанный также слитно или через дефис), как применяют в настоящем документе, относится к типичной форме растения или гена, как она наиболее часто встречается в природе. "Растение дикого типа" относится к растению с наиболее распространенным фенотипом такого растения в природной популяции. "Аллель дикого типа" относится к аллелю гена, необходимому для получения фенотипа дикого типа. В отличие от этого "мутантное растение" относится к растению с отличным редким фенотипом такого растения в природной популяции или полученному посредством вмешательства человека, например, посредством мутагенеза, и "мутантный аллель" относится к аллелю гена, необходимому для получения мутантного фенотипа.

Как применяют в настоящем документе, термин "IND дикого типа" (например, IND-A1 или IND-C1 дикого типа), обозначает встречающийся в природе аллель IND, обнаруженный у растений, в частности растений Brassicacea, особенно растений Brassica, кодирующий функциональный белок IND (например, функциональный IND-A1 или IND-C1, соответственно). В отличие от этого, термин "мутантный IND" (например мутантный IND-A1 или IND-C1), как применяют в настоящем документе, относится к аллелю IND, который не кодирует функциональный белок IND, т.е. аллелю IND, кодирующему нефункциональный белок IND (например, нефункциональный IND-A1 или IND-C1, соответственно), который, как применяют в настоящем документе, относится к белку IND, не обладающему биологической активностью или обладающему значительно уменьшенной биологической активностью по сравнению с соответствующим функциональным белком IND дикого типа, или совсем не кодирующему белок IND. "Полностью нокаутированный" или "нулевой" мутантный аллель IND, как применяют в настоящем документе, относится к мутантному аллелю IND, который кодирует белок IND, не обладающий биологической активностью по сравнению с соответствующим функциональным белком IND дикого типа, или который совсем не кодирует белок. Такой "полностью нокаутированный мутантный аллель IND" представляет собой, например, аллель IND дикого типа, который содержит одну или несколько мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, например одну или несколько нонсенс- или миссенс-мутаций, в частности такой полностью нокаутированный мутантный аллель IND представляет собой аллель IND дикого типа, содержащий мутацию, которая предпочтительно приводит к продукции белка IND с отсутствием по меньшей мере одного функционального домена, такого как активирующий домен, ДНК-связывающий домен и/или домен для димеризации, или с отсутствием по меньшей мере одной аминокислоты, критической для его функции, такой как аминокислота, критическая для связывания ДНК, например, аргинин в положении 127 в SEQ ID NO: 2 или в положении 140 в SEQ ID NO: 4 и т.п., или глутамин в положении 122 в SEQ ID NO: 2 или в положении 135 в SEQ ID NO: 4 и т.п., так что биологическая активность белка IND полностью прекращена, или при этом мутация(мутации) предпочтительно приводит к отсутствию продукции белка IND. "Частично нокаутированный" мутантный аллель IND, как применяют в настоящем документе, относится к мутантному аллелю IND, который кодирует белок IND, обладающий значительно уменьшенной биологической активностью по сравнению с соответствующим функциональным белком IND дикого типа. Такой "частично нокаутированный мутантный аллель IND" представляет собой, например, аллель IND дикого типа, который содержит одну или несколько мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, например, одну или более миссенс-мутаций. В частности, такой частично нокаутированный мутантный аллель IND представляет собой аллель IND дикого типа, содержащий мутацию, которая, предпочтительно, приводит к продукции белка IND, где по меньшей мере одна консервативная и/или функциональная аминокислота заменена другой аминокислотой, так что биологическая активность значительно уменьшена, но не полностью прекращена. Такой полностью или частично нокаутированный мутантный аллель IND может кодировать также доминантно негативный белок IND, способный оказывать неблагоприятное влияние на биологическую активность других белков IND внутри той же самой клетки. Такой доминантно негативный белок IND может представлять собой белок IND, который еще является способным взаимодействовать с теми же элементами, как и белок IND дикого типа, но который блокирует некоторые аспекты его функции. Примерами доминантно негативных белков IND являются белки IND с отсутствием активирующего домена и/или домена для димеризации или конкретных аминокислотных остатков, критических для активации и/или димеризации, но еще содержащие ДНК-связывающий домен, так что не только их собственная биологическая активность уменьшена или прекращена, но они могут дополнительно уменьшать общую активность IND в клетке посредством конкуренции с относящимися к дикому типу и/или частично нокаутированными белками IND, присутствующими в клетке, за участки связывания ДНК. Другими примерами доминантно негативных белков IND являются белки IND с отсутствием активирующего домена и/или ДНК-связывающего домена или конкретных аминокислотных остатков, критических для активации и/или связывания ДНК, но еще содержащие домен для димеризации, так что не только их собственная биологическая активность уменьшена или прекращена, но они могут дополнительно уменьшать общую активность IND в клетке посредством образования димеров белка с отсутствием по меньшей мере одного функционального домена. Мутантные аллели кодирующие белок IND последовательностей нуклеиновой кислоты обозначены "ind" (например, ind-a1 или ind-c1, соответственно) в настоящем документе. Мутантные аллели могут представлять собой либо "естественные мутантные" аллели, которые представляют собой мутантные аллели,

обнаруженные в природе (например, полученные спонтанно без применения человеком мутагенов), или "индуцированные мутантные" аллели, индуцированные посредством вмешательства человека, например, посредством мутагенеза.

"Значительно уменьшенное количество функционального белка IND" (например, функционального белка IND-A1 или IND-C1) относится к уменьшению 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. клетка не продуцирует функциональный белок IND) по сравнению с количеством функционального белка IND, продуцируемого клеткой, не содержащей мутантного аллеля IND. Это определение включает продукцию "нефункционального" белка IND (например, усеченного белка IND), не обладающего биологической активностью *in vivo*, уменьшение абсолютного количества функционального белка IND (например, не образуется функционального белка IND из-за мутации в гене IND), продукцию белка IND со значительно уменьшенной биологической активностью по сравнению с активностью функционального белка IND дикого типа (такого как белок IND, в котором один или несколько аминокислотных остатков, которые являются принципиальными для биологической активности кодируемого белка IND, как проиллюстрировано ниже, заменены другим аминокислотным остатком), и/или неблагоприятный эффект доминантно негативных белков IND на другие функциональные и/или частично функциональные белки IND.

Термин "мутантный белок IND", как применяют в настоящем документе, относится к белку IND, кодируемому мутантной последовательностью нуклеиновой кислоты IND ("аллель ind"), в соответствии с чем мутация приводит к значительному уменьшению и/или отсутствию активности IND *in vivo*, по сравнению с активностью белка IND, кодируемого не являющейся мутантной последовательностью IND дикого типа ("аллель IND").

"Мутагенез", как применяют в настоящем документе, относится к процессу, при котором клетки растений (например, множество семян или других частей Brassica, таких как пыльца и т.д.) подвергают воздействию способами, которые индуцируют мутации в ДНК клеток, таким как контакт с мутагенным средством, таким как химическое вещество (таким как этилметилсульфонат (EMS), этилнитрозомочевина (ENU) и т.д.) или ионизирующее излучение (нейтроны (такие как при быстром нейтронном мутагенезе и т.д.), альфа-излучение, гамма-излучение (такое как обеспечиваемое источником из кобальта 60), рентгеновское излучение, УФ излучение и т.д.), или комбинация двух или более из них. Таким образом, желательный мутагенез одного или нескольких аллелей IND можно осуществлять применением химических способов, таких как приведение в контакт одной или нескольких тканей растения с этилметилсульфонатом (EMS), этилнитрозомочевинной и т.д., посредством применения физических способов, таких как рентгеновское излучение и т.д., или посредством гамма-излучения, такого как обеспечиваемое источником из кобальта 60. В то время как мутации, полученные излучением, часто представляют собой большие делеции или другие обширные поражения, такие как транслокации или комплексные перестройки, мутации, полученные посредством химических мутагенов, часто представляют собой более дискретные поражения, такие как точечные мутации. Например, EMS алкилирует гуаниновые основания, что приводит к ошибочному спариванию оснований: алкилированный гуанин спаривается с тиминовым основанием, что в первую очередь приводит к заменам G/C на A/T. После мутагенеза растения Brassica регенерируют из обработанных клеток с использованием известных способов. Например, полученные семена Brassica можно высевать в соответствии с общепринятыми способами выращивания, и после самоопыления на растениях образуются семена. Альтернативно, можно выделять двойные гаплоидные проростки, чтобы сразу формировать гомозиготные растения, например, как описано в 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, можно собирать и проводить скрининг по присутствию мутантных аллелей IND. Известно несколько способов скрининга специфических мутантных аллелей, например, в Deleteagene™ (Delete-a-gene; Li et al., 2001, Plant J. 27: 235-242) используют анализы полимеразной цепной реакцией (ПЦР) для скрининга делеционных мутантов, полученных быстрым нейтронным мутагенезом, с помощью TILLING (направленные индуцированные локальные повреждения в геномах; McCallum et al., 2000, Nat. Biotechnol. 18:455-457) идентифицируют EMS-индуцированные точечные мутации и т.д. Дополнительные способы для скрининга присутствия специфических мутантных аллелей IND описаны в примерах ниже.

Как применяют в настоящем документе, термин "не встречающийся в природе" или "культивированный" при применении по отношению к растению обозначает растение с геномом, модифицированным человеком. Трансгенное растение, например, представляет собой не встречающееся в природе растение, содержащее экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, например, химерный ген, содержащий транскрибируемую область, при транскрипции которой образуется биологически активная молекула РНК, способная уменьшать экспрессию эндогенного гена, такого как ген IND, и, таким образом, было генетически модифицировано человеком. Кроме того, растение, содержащее мутацию в эндогенном гене, например, мутацию в эндогенном гене IND (например, в регуляторном элементе или в кодирующей последовательности) в результате воздействия мутагенного средства, также рассматривают как неприродное



растение, поскольку оно было генетически модифицировано человеком. Более того, растение конкретного вида, такое как *Brassica napus*, содержащее мутацию в эндогенном гене, например в эндогенном гене IND, которая в природе не встречается в этом конкретном виде растений, в результате, например, спосовов направленной селекции, таких как селекция с использованием маркера и скрещивание или интрогрессия, с помощью растения того же самого или другого вида, такого как *Brassica juncea* или гара, для этого растения, также рассматривают как не встречающееся в природе растение. В отличие от этого растение, содержащее только спонтанные или встречающиеся в природе мутации, т.е. растение, которое не было генетически модифицировано человеком, не является "не встречающимся в природе растением", как определено в настоящем документе, и, таким образом, не включено в изобретение. Специалисту в данной области понятно, что в то время как не встречающееся в природе растение, как правило, обладает нуклеотидной последовательностью, которая является измененной по сравнению с встречающимся в природе растением, не встречающееся в природе растение также может быть генетически модифицировано человеком без изменения его нуклеотидной последовательности, например, посредством модификации характера его метилирования.

Термин "ортолог" гена или белка в настоящем документе обозначает гомологичный ген или белок, обнаруженный в другом виде, обладающий такой же функцией, как ген или белок, но (обычно) расходящийся по последовательности от момента времени, в котором разошлись виды, несущие гены (т.е. гены, развившиеся от общего предка посредством видообразования). Ортологи генов IND *Brassica napus* можно, таким образом, идентифицировать в другом виде растений (например, *Brassica juncea* и т.д.) на основании сравнений последовательности (например, на основе процентов идентичности последовательности на протяжении полной последовательности или на протяжении специфических доменов) и/или функционального анализа.

"Сорт" применяют в настоящем документе в соответствии с конвенцией UPOV, и он обозначает группировку растений внутри отдельного ботанического таксона самого низкого известного ранга, где группировку можно определить по экспрессии признаков, происходящих от данного генотипа или комбинации генотипов, можно отличить от другой группировки растений по экспрессии по меньшей мере одного из указанных признаков, и ее рассматривают как единицу по отношению к ее пригодности для размножения неизменной (стабильной).

Термин "содержащий" следует интерпретировать как обозначающий присутствие указанных частей, стадий или компонентов, но не исключающий присутствие одного или нескольких дополнительных частей, стадий или компонентов. Растение, содержащее конкретный признак, может, таким образом, содержать дополнительные признаки.

Понятно, что при ссылке на слово в единственном числе (например, растение или корень), множественное число также включено в ссылку (например, множество растений, множество корней). Таким образом, ссылка на элемент в единственном числе не исключает возможности присутствия более одного элемента, если контекст явно не требует присутствия одного и только одного из элементов. Термин в единственном числе, таким образом, обычно обозначает "по меньшей мере один".

Для целей этого изобретения, "идентичность последовательности" двух родственных нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, выраженная в процентах, относится к числу положений в двух оптимально выровненных последовательностях с идентичными остатками ( $\times 100$ ), деленному на число сравниваемых положений. Пропуск, т.е. положение при выравнивании, где остаток присутствует в одной последовательности, но не в другой, рассматривают в качестве положения с не идентичными остатками. "Оптимальное выравнивание" двух последовательностей определяют выравниванием двух последовательностей по всей длине согласно алгоритму глобального выравнивания Нидльмана и Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48(3):443-53) in The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16(6): 276-277; см., например, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>) с использованием параметров по умолчанию (штраф за внесение делеции = 10 (для нуклеотидов)/10 (для белков) и штраф за продолжение делеции = 0,5 (для нуклеотидов)/0,5 (для белков)). Для нуклеотидов используемой по умолчанию матрицей баллов является EDNAFULL, а для белков используемой по умолчанию матрицей баллов является EBLOSUM62.

"По существу идентичные" или "в основном сходные", как применяют в настоящем документе, относится к последовательностям, которые при оптимальном выравнивании, как определено выше, разделяют, по меньшей мере, конкретный минимальный процент идентичности последовательности (как определено далее ниже).

"Строгие условия гибридизации" можно использовать для идентификации нуклеотидных последовательностей, являющихся, по существу, идентичными данной нуклеотидной последовательности. Строгие условия зависят от последовательности и могут являться различными при различных обстоятельствах. Как правило, выбирают строгие условия приблизительно на 5°C ниже термической точки плавления ( $T_m$ ) для специфической последовательности при определенной ионной силе и pH.  $T_m$  представляет собой температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% последовательности-мишени гибридизуется с полностью совпадающим зондом. Как правило, выбирают строгие условия, при которых концентрация соли является приблизительно 0,02 молярной при pH 7, и температура составляет по

меньшей мере 60°C. Снижение концентрации соли и/или увеличение температуры увеличивает строгость. Строгими условиями для гибридизации РНК-ДНК (Нозерн-блоттинг с использованием зонда, например, из 100н.), являются, например, условия, включающие в себя по меньшей мере одну отмывку в 0,2× SSC при 63°C в течение 20 мин, или эквивалентные условия.

"Условия высокой строгости" можно обеспечивать, например, гибридизацией при 65°C в водном растворе, содержащем 6× SSC (20× SSC содержит 3,0М NaCl, 0,3М Na-цитрат, pH 7,0), 5× раствор Денхардта (100× раствор Денхардта содержит 2% фиколл, 2% поливинилпирролидон, 2% бычий сывороточный альбумин), 0,5% додецилсульфат натрия (SDS) и 20 мкг/мл денатурированной ДНК-носителя (одноцепочечная ДНК спермы рыб, со средней длиной 120-3000 нуклеотидов) в качестве неспецифического конкурента. После гибридизации отмывку высокой строгости можно проводить в несколько стадий, с конечной отмывкой (приблизительно 30 мин) при температуре гибридизации в 0,2-0,1 × SSC, 0,1% SDS.

"Условия средней строгости" относятся к условиям, эквивалентным гибридизации в вышеописанном растворе, но при приблизительно 60-62°C. Отмывку средней строгости можно проводить при температуре гибридизации в 1× SSC, 0,1% SDS.

"Низкая строгость" относится к условиям, эквивалентным гибридизации в вышеописанном растворе при приблизительно 50-52°C. Отмывку низкой строгости можно проводить при температуре гибридизации в 2× SSC, 0,1% SDS. См. также Sambrook et al. (1989) и Sambrook и Russell (2001).

"Увеличенный собранный урожай" или "увеличенный урожай семян или зерна" обозначает большее количество семян или зерна, собранного с множества растений, каждое из которых содержит мутантные аллели IND по изобретению, по сравнению с количеством семян или зерна, собранного от сходного числа изогенных растений без мутантных аллелей IND. Урожай, как правило, выражают в единицах объема собранного зерна на единицу поверхности, таких как бушель/акр или кг/га. Увеличение урожая, как правило, выражают в процентах, в соответствии с чем урожай для эталонного или контрольного растения обозначают как 100%, и урожай растений по изобретению выражают в % относительно урожая контрольного растения. Наблюдаемое увеличение урожая для растений Brassica по изобретению лежало в диапазоне по меньшей мере от 101% до по меньшей мере 124%, и ожидают, что более высокое увеличение урожая является осуществимым. Увеличение урожая может также лежать в диапазоне от 104 до 108% или от 105 до 110%.

#### Подробное описание

Как описано в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052), ранее обнаружено, что для растений Brassica napus, которые являются гомозиготными по полностью нокаутированному аллелю ind только в одном из их двух генов IND, т.е. в IND-A1 или IND-C1, не показали значительного увеличения устойчивости к растрескиванию стручков по сравнению с растениями Brassica napus, не содержащими мутантных аллелей IND, в то время как у растений Brassica napus, которые являлись гомозиготными по полностью нокаутированному аллелю ind в обоих генах IND, устойчивость к растрескиванию стручков являлась значительно увеличенной, но уровень устойчивости к растрескиванию стручков являлся слишком высоким для поддержания агрономически релевантной обмолачиваемости. В отличие от этого устойчивость к растрескиванию стручков являлась значительно увеличенной у растений Brassica napus, содержащих три полностью нокаутированных аллеля ind из двух генов IND Brassica napus, до уровня, при котором растения сохраняли агрономически релевантную обмолачиваемость стручков.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что растения Brassica napus с фенотипом растрескивания стручков, сходным с растениями Brassica, описанными в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052), т.е. которые сочетают увеличенную устойчивость к растрескиванию стручков с агрономически релевантной обмолачиваемостью стручков, можно также получить комбинацией двух частично нокаутированных мутантных аллелей IND с двумя полностью нокаутированных мутантными аллелями IND вместо комбинации трех полностью нокаутированных мутантных аллелей IND. Кроме того, обнаружено, что мутации в гене IND-C1 приводили к более сильному увеличению устойчивости к растрескиванию стручков, чем мутации в гене IND-A1. Более сильное увеличение устойчивости к растрескиванию стручков у растений Brassica napus, например наблюдали, когда два полностью нокаутированных мутантных аллеля IND представляли собой полностью нокаутированные мутантные аллели IND из гена IND-C1 и два частично нокаутированных мутантных аллеля IND представляли собой частично нокаутированные мутантные аллели IND из гена IND-A1, чем когда два полностью нокаутированных мутантных аллеля IND происходили из гена IND-A1, и частично нокаутированные мутантные аллели IND происходили из гена IND-C1. Неожиданно, растения Brassica napus, сочетающие увеличенную устойчивость к растрескиванию стручков с агрономически релевантной обмолачиваемостью стручков, возможно получить введением только двух частично нокаутированных мутантных аллелей IND, в частности гена, IND-C1.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения настоящая заявка относится к растению Brassica, содержащее по меньшей мере два гена IND, в частности растение Brassica napus, содержащее ген IND-A1 и IND-C1, отличающееся тем, что оно содержит два частично нокаутированных мутант-

ных аллеля IND в геноме, в частности, гена IND-A1 и/или IND-C1, предпочтительно, гена IND-C1, в соответствии с чем аллели ind приводят к значительно уменьшенному количеству функционального белка IND типа, кодируемого эквивалентом дикого типа для этих мутантных аллелей, и таким образом, к общему значительно уменьшенному количеству функциональных белков IND, продуцируемых в клетках растения, конкретно, в развивающихся стручках с семенами, *in vivo*.

В другом варианте осуществления растение Brassica дополнительно содержит два полностью нокаутированных мутантных аллеля IND в геноме, в частности гена IND-C1 и/или гена IND-A1, соответственно, предпочтительно гена IND-C1, таких как описанные в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052), например ind-a1-ems01, ind-a1-ems05, ind-c1-ems01 или ind-c1-ems03 и т.п.

Считают, что посредством комбинации достаточного числа копий специфических частично нокаутированных мутантных аллелей IND с достаточным числом копий специфических полностью нокаутированных аллелей IND мутантного и/или дикого типа в одном растении, в частности растении Brassica, является возможной точная регуляция количества и/или типа полученных функциональных белков IND, что в свою очередь влияет на свойства растрескивания плода растения. Абсолютное и относительное количество белков IND можно таким образом регулировать так, чтобы получать растения, продуцирующие достаточно белка(белков) IND для обеспечения агрономически релевантной обмолачиваемости стручков с семенами, в то же время уменьшая осыпание семян до или во время сбора урожая.

Таким образом, другой вариант осуществления изобретения относится к растению, в частности растению Brassica, содержащему по меньшей мере один частично нокаутированный мутантный аллель IND, который кодирует частично функциональный белок IND, такой как аллели, описанные ниже, например ind-a1-ems01, ind-a1-ems09, ind-a1-ems13, ind-c1-ems04, ind-c1-ems08 или ind-c1-ems09 и т.п., в то время как оставшиеся аллели могут представлять собой аллели IND, частично нокаутированные, полностью нокаутированные и/или дикого типа.

В одном аспекте изобретения представлено растение Brassica, содержащее по меньшей мере два гена IND, в частности растение Brassica napus, содержащее два частично нокаутированных аллеля ind и  $n$ -кратные полностью нокаутированные аллели ind двух генов IND в этом растении Brassica, в частности генов IND-A1 и/или IND-C1 Brassica napus, предпочтительно гена IND-C1, при этом  $n \leq 2$  (например,  $n=0$ , 1 или 2), так что по меньшей мере один аллель продуцирует по меньшей мере частично функциональный белок IND.

Следующий аспект изобретения относится к растению вида Brassica, гомозиготному по одиночной мутации IND ( $n=2$ , т.е. гомозиготному по частично нокаутированному мутантному аллелю одного гена IND), и/или гомозиготному по двойной мутации IND ( $n=4$ , т.е. гомозиготному по полностью и/или частично нокаутированному мутантному аллелю двух генов IND), содержащему по меньшей мере два гена IND, в частности, из Brassica napus, при этом мутантные аллели представляют собой мутантные аллели двух генов IND в этом растении Brassica, в частности генов IND-A1 и/или IND-C1. Такие мутантные растения можно согласно этому изобретению использовать для целей скрещивания.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения, настоящая заявка относится к растению Brassica napus, гомозиготному по одиночной частично нокаутированной мутации IND, где генотип растения можно описать как ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>, IND-C1/IND-C1, или IND-A1/IND-A1, ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>. В другом варианте осуществления изобретения настоящая заявка относится к растению Brassica napus, гомозиготному по двойной частичной мутации IND, где генотип растения можно описать как ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>, ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>. В дополнительном варианте осуществления изобретения настоящая заявка относится к растению Brassica napus, гомозиготному по двойной частичной и полной мутации IND, где генотип растения можно описать как или ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>, ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup> или ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>, ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>.

Кроме того, настоящая заявка относится к новым последовательностям нуклеиновой кислоты частично нокаутированных мутантных генов/аллелей IND из вида Brassica, также как к частично нокаутированным мутантным белкам IND. Представлены также способы получения и комбинации частично нокаутированных мутантных аллелей IND в растениях Brassica, также как растения и части растения Brassica, содержащие конкретные комбинации полностью и частично нокаутированных мутантных аллелей IND в геноме, при помощи чего осыпание семян уменьшено у этих растений. Применение этих растений для переноса частично нокаутированных мутантных аллелей IND другим растениям также представляет собой вариант осуществления изобретения, также как продукты растений из любого из описанных растений. Кроме того, представлены наборы и способы для селекции с использованием маркера (MAS) для комбинации или детекции генов и/или аллелей IND. Каждый из вариантов осуществления изобретения подробно описан ниже.

Растения Brassica, описанные в настоящем документе, обладающие уменьшенным или замедленным осыпанием семян, обладают увеличенным урожаем собранных семян. Однако наблюдали, что не только урожай собранных семян от растения Brassica, содержащего только аллель ind-c1-09 в гомозиготном состоянии (для которого показали подающийся наблюдению фенотип уменьшенного или замедленного осыпания семян), но также урожай собранных семян от других растений Brassica, содержащих только два мутантных аллеля IND в гомозиготном состоянии, т.е. где генотип растения можно описать

как  $ind-a1^P/ind-a1^P$ ,  $IND-C1/IND-C1$ , или  $IND-A1/IND-A1$ ,  $ind-c1^P/ind-c1^P$ , также являлся значительно увеличенным по сравнению с изогенными растениями Brassica, не содержащими мутантных аллелей IND, несмотря на отсутствие поддающегося наблюдению фенотипа уменьшенного или замедленного осыпания семян в растениях Brassica, содержащих мутантные аллели IND. Изобретение, таким образом, относится также к растениям Brassica, содержащим по меньшей мере два гена IND, где по меньшей мере два аллеля продуцируют функциональный белок IND, где растения обладают более высоким урожаем семян. Понятно, что два мутантных аллеля в локусе IND-A или в локусе IND-C могут представлять собой один и тот же мутантный аллель или различные мутантные аллели.

Последовательности нуклеиновой кислоты по изобретению.

Представлены частично нокаутированные мутантные последовательности нуклеиновой кислоты  $ind$ , кодирующие частично функциональные белки IND, т.е. белки IND со значительно уменьшенной биологической активностью (т.е. последовательности нуклеиновой кислоты IND, содержащие одну или несколько мутаций, которые приводят к значительно уменьшенной биологической активности кодируемого белка IND) генов IND из Brassicaceae, в частности из вида Brassica, особенно из Brassica napus, но также из другого сельскохозяйственного вида Brassica. Например, вид Brassica, содержащий геном A и/или C, может содержать аллели генов IND-A1 или IND-C1, которые являются в основном сходными с частично нокаутированными мутантными аллелями IND по настоящему изобретению и которые можно идентифицировать и комбинировать в отдельном растении по изобретению. Кроме того, способы мутагенеза можно использовать для получения мутаций в аллелях IND дикого типа, таким образом, получая мутантные аллели  $ind$ , в основном сходные с частично нокаутированными мутантными аллелями IND по настоящему изобретению, для применения по изобретению. Поскольку специфические аллели IND предпочтительно комбинируют в растении посредством скрещивания и селекции, в одном варианте осуществления последовательности нуклеиновой кислоты  $ind$  представлены в растении (т.е. эндогенно), например, в растении Brassica, предпочтительно в растении Brassica, которое можно скрещивать с Brassica napus или которое можно использовать для получения "синтетического" растения Brassica napus. Гибридизация между различными видами Brassica описана в данной области, например, как ссылаются в Snowden (2007, Chromosome research 15: 85-95). Межвидовую гибридизацию можно, например, использовать для переноса генов, например из генома C в B.napus (AACC) в геном C в B.carinata (BBCC), или даже, например, из генома C в B.napus (AACC) в геном B в B.juncea (AABB) (посредством спорадического события незаконной рекомбинации между их геномами C и B). "Ресинтезированные" или "синтетические" линии Brassica napus можно получать скрещиванием исходных предков, B.oleracea (CC) и B.rapa (AA). Межвидовые, а также межродовые барьеры несовместимости можно успешно преодолевать при скрещивании между сельскохозяйственными видами Brassica и родственными им, например, посредством способов эмбрионального спасения или слияния протопластов (см., например Snowden, выше).

Однако выделенные последовательности нуклеиновой кислоты  $ind$  (например, выделенные из растения клонированием или полученные синтетически синтезом ДНК), также как их варианты и фрагменты любого из них, также представлены в настоящей заявке, как их можно использовать для определения, какая последовательность эндогенно присутствует в растении или части растения, кодирует ли последовательность функциональный, частично функциональный, нефункциональный белок или не кодирует белка (например, по экспрессии в рекомбинантной клетке-хозяине, как описано ниже), и для отбора и переноса специфических аллелей от одного растения в другое, для получения растения с желательной комбинацией частично и/или полностью нокаутированных мутантных аллелей IND.

Новые частично нокаутированные мутантные последовательности нуклеиновой кислоты IND дикого типа IND-A1 и IND-C1 выделены из Brassica napus. Последовательности IND дикого типа, как описано в WO99/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052) изображены в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 7 из списка последовательностей, в то время как новые частично нокаутированные мутантные последовательности  $ind$  из этих последовательностей, и последовательности, в основном сходные с этими, описаны в настоящем документе ниже и в примерах, по отношению к последовательностям IND дикого типа. Геномная ДНК, кодирующая белок IND, из Brassica napus не содержит интронов.

"Последовательности нуклеиновой кислоты IND-A1" или "последовательности нуклеиновой кислоты вариантов 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% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2, 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% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5. Эти последовательности нуклеиновой кислоты можно обозначить также как являющиеся "в основном сходными" или "по существу идентичными" с последовательностями IND, представленными в списке последовательностей.

"Последовательности нуклеиновой кислоты IND-C1" или "последовательности нуклеиновой кислоты вариантов 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% идентичностью последовательности с 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), 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% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 (IND-C1-long), с SEQ ID NO: 3 от нуклеотида в положении 46 до нуклеотида в положении 633 (IND-C1-short) или с SEQ ID NO: 7. Эти последовательности нуклеиновой кислоты можно также обозначить как являющиеся "в основном сходными" или "по существу идентичными" с последовательностями IND представленные в списке последовательностей.

Таким образом, изобретение относится к новым частично нокаутированным мутантным последовательностям нуклеиновой кислоты из последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих функциональные белки IND-A1 и IND-C1 дикого типа, включая их варианты и фрагменты (как определено далее ниже), при этом мутация в последовательности нуклеиновой кислоты предпочтительно приводит к вставке, делеции или замене одной или нескольких аминокислот по сравнению с белком IND дикого типа, в частности, к замене одной или нескольких аминокислот, и при этом биологическая активность белка IND является значительно уменьшенной. Значительное уменьшение биологической активности белка IND в настоящем документе относится к уменьшению активности связывания ДНК, способности к димеризации и/или активности регуляции транскрипции белка IND, так что устойчивость к растрескиванию стручков растения, экспрессирующего мутантный белок IND, является увеличенной по сравнению с растением, экспрессирующим соответствующий белок IND дикого типа.

Для определения функциональности специфического аллеля IND/белка в растениях, в частности в растениях Brassica, уровень устойчивости к растрескиванию стручков в растениях можно определить проведением макроскопического, микроскопического и гистологического анализов плодов и цветов растений, содержащих специфический аллель/белок IND, и соответствующего аналогичного растения дикого типа в анализах, проведенных на плодах и цветах Arabidopsis, как описано в Liljegren et al. (2004, выше), или как описано в примерах ниже. Кратко, изменения устойчивости к растрескиванию стручков можно оценивать и/или измерять, например, посредством макроскопических тестов, таких как обследование стручков с семенами невооруженным глазом для оценки, например, присутствия или отсутствия границы створок, длины носика стручков и т.д.; ручного испытания на ударную нагрузку (MIT) для сравнения уровня устойчивости к растрескиванию стручков между различными мутантными линиями IND и соответствующими линиями дикого типа, оценкой простоты открытия стручка при мягком скручивании стручков; теста испытания на случайную ударную нагрузку (RIT) для сравнения обмолачиваемости стручков с семенами от растений из различных мутантных линий IND и соответствующих линий дикого типа, соответственно, посредством измерения полужизни образцов стручков из этих линий; и/или посредством микроскопических тестов для определения, например, влияют ли и как влияют мутации в IND на клетки на границах створок и в зоне растрескивания стручков с семенами. После идентификации и характеристики партнера по димеризации белка IND (например, самого белка IND в случае, если его функционирование зависит от формирования гомодимера, или другого белка в случае, если его функционирование зависит от формирования гетеродимера), и/или гена(генов), транскрипцию которых регулирует белок IND, функциональность специфического аллеля/белка IND можно альтернативно оценивать способами рекомбинантной ДНК, как известно в данной области, например, посредством совместной экспрессии обоих партнеров димера в клетке-хозяине (например, бактерии, такой как E.coli) и оценки, могут ли еще формироваться димеры, если димеры еще могут связываться с участком связывания bHLH регулируемого гена(генов), и/или если транскрипция этого гена(генов) еще регулируется этим связыванием.

Как эндогенные, так и выделенные последовательности нуклеиновой кислоты представлены в настоящем документе. Представлены также фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты мутантных последовательностей IND и мутантных вариантов IND, определенных выше, для применения в качестве праймеров или зондов и в качестве компонентов наборов согласно другому аспекту изобретения (см. далее ниже). "Фрагмент" последовательности нуклеиновой кислоты ind или его варианта (как определено) могут обладать различной длиной, например, по меньшей мере 10, 12, 15, 18, 20, 50, 100, 200, 500, 600 последовательных нуклеотидов из последовательности (или варианта последовательности) IND или ind.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие функциональные белки IND.

Последовательности нуклеиновой кислоты, показанные в списке последовательностей, кодируют функциональные белки IND дикого типа из Brassica napus. Таким образом, эти последовательности являются эндогенными для растений Brassica napus, из которых они выделены. Можно проводить скрининг других сельскохозяйственных видов, сортов, генеалогических линий или диких образцов Brassica по другим аллелям IND, кодирующим такие же белки IND или их варианты. Например, способы гибридизации нуклеиновых кислот (например, анализ Саузерн-блоттингом, с использованием, например, строгих условий гибридизации) или способы на основе ПЦР можно использовать для идентификации аллелей IND, эндогенных для других растений Brassica, таких как различные сорта, линии или образцы Brassica napus, а также можно проводить скрининг растений, органов и тканей Brassica juncea (особенно аллели IND в A-геноме), Brassica carinata (особенно аллели IND в C-геноме) и Brassica rapa (A-геном) и Brassica

oleracea (C-геном) по другим аллелям IND дикого типа. Для скрининга таких растений, органов или тканей растений по присутствию аллелей IND, можно использовать последовательности нуклеиновой кислоты IND, представленные в списке последовательностей, или варианты или фрагменты любого из этого. Например полные последовательности или фрагменты можно использовать в качестве зондов или праймеров. Например, специфические или вырожденные праймеры можно использовать для амплификации последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующей белки IND, из геномной ДНК растения, органа или ткани растения. Эти последовательности нуклеиновой кислоты IND можно выделять и секвенировать с использованием общепринятых способов молекулярной биологии. Затем можно использовать биоинформатический анализ для характеристики аллеля(аллелей), например, чтобы определить, какому аллелю IND соответствует последовательность, и какой белок или вариант белка IND кодирует последовательность.

Кодирует ли последовательность нуклеиновой кислоты функциональный белок IND, можно анализировать способами рекомбинантной ДНК, как известно в данной области, например, посредством теста генетической комплементации с использованием, например, растения *Arabidopsis*, которое является гомозиготным по полностью нокаутированному мутантному аллелю *ind*, или растения *Brassica napus*, которое является гомозиготным по полностью нокаутированному мутантному аллелю *ind* обоих генов IND-A1 и IND-C1.

Кроме того, понятно, что последовательности нуклеиновой кислоты IND и их варианты (или фрагменты любой из них) можно идентифицировать *in silico*, посредством скрининга баз данных нуклеиновой кислоты по в основном сходным последовательностям. Подобным образом, последовательность нуклеиновой кислоты можно синтезировать химически. Представлены также фрагменты молекул нуклеиновой кислоты по изобретению, которые описаны далее ниже. Фрагменты включают в себя последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие только домен bHLH, или более мелкие фрагменты, содержащие часть домена bHLH, такую как основной домен или домен HLH, и т.д.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие мутантные белки IND.

Изобретение относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, содержащим одну или несколько делеций, вставок или замен нуклеотидов относительно последовательностей нуклеиновой кислоты IND дикого типа, показанных в SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7 из списка последовательностей, где мутация(мутации) в последовательности нуклеиновой кислоты приводит к значительно уменьшенной биологической активности, т.е. частично нокаутированной биологической активности кодируемого белка IND относительно белка IND дикого типа, также как к фрагментам таких мутантных молекул нуклеиновой кислоты. Такие мутантные последовательности нуклеиновой кислоты (обозначаемые последовательности *ind<sup>p</sup>*) можно получать и/или идентифицировать с использованием различных известных способов, как описано далее ниже. И в этом случае такие молекулы нуклеиновой кислоты представлены как в эндогенной форме, так и в выделенной форме.

В основном, любая мутация в последовательностях нуклеиновой кислоты IND дикого типа, которая приводит к белку IND, содержащему по меньшей мере одну вставку, делецию и/или замену аминокислоты относительно белка IND дикого типа, может приводить к значительному уменьшению или отсутствию биологической активности. Однако понятно, что конкретные мутации в белке IND, наиболее вероятно, приводят к полному прекращению биологической активности белка IND, такие как мутации, при которых значительные части функциональных доменов, таких как ДНК-связывающий домен ("b"), домен для димеризации ("HLH") и/или домены регуляции транскрипции, отсутствуют, или при которых конкретные критические аминокислотные остатки в этих доменах, такие как аминокислоты Gln (Q), Ala (A) и Arg (R) в положениях 5, 9 и 13 или основные аминокислотные остатки (в частности остатки Arg (R)) в положениях 10 и 12 консенсусной последовательности домена bHLH, определенного Heim et al. (2003, Mol Biol Evol 20, 735-747; соответствующие положениям 123, 127 и 131, и 128 и 130, соответственно, в SEQ ID NO: 10, см. табл. 1), отсутствуют или заменены, предпочтительно, не сходными или не консервативными аминокислотами, в то время как другие мутации в белке IND, наиболее вероятно, приводят к значительному уменьшению биологической активности белка IND, такие как мутации, приводящие к заменам конкретных аминокислот, например, консервативных аминокислот, указанных в табл. 1, вызывающим менее эффективное связывание ДНК, менее эффективную димеризацию и/или менее эффективную регуляцию транскрипции без полного прекращения биологической активности кодируемого белка IND. В WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052) описаны, например, полностью нокаутированные мутантные аллели IND, в частности *ind-a1-ems01*, *ind-c1-ems01* и *ind-c1-ems03*, содержащие нонсенс-мутации, приводящие к продукции усеченных белков IND с отсутствием домена bHLH, и полностью нокаутированные мутантные аллели IND, в частности *ind-a1-ems05*, кодирующий мутантный белок IND, в котором консервативный Arg в положении 10 консенсусного домена bHLH заменен на ароматический His, тогда как настоящее изобретение относится к частично нокаутированным мутантным аллелям IND, в частности, например, *ind-c1-ems09*, кодирующему мутантный белок IND, в котором консервативный Ala в положении 9 консенсусного домена bHLH заменен на Thr, и *ind-c1-ems04*, кодирующему мутантный белок IND, в котором консервативный Arg в положении 12 консенсусного домена bHLH заменен на Cys.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут содержать одну или нескольких мутаций, таких как "миссенс-мутация", которая представляет собой изменение в последовательности нуклеиновой кислоты, приводящее к замене аминокислоты на другую аминокислоту;

"нонсенс-мутация" или "СТОП-кодон-мутация", которая представляет собой изменение в последовательности нуклеиновой кислоты, приводящее к введению преждевременного СТОП-кодона и таким образом, к терминации трансляции (приводящей к усеченному белку); гены растений содержат СТОП-кодоны трансляции "TGA" (UGA в РНК), "TAA" (UAA в РНК) и "TAG" (UAG в РНК); таким образом, любая замена, вставка, делеция нуклеотида, которая приводит к присутствию одного из этих кодонов в зрелой мРНК, подлежащей трансляции (в рамке считывания), может привести к терминации трансляции;

"мутация вставки" одной или нескольких аминокислот из-за добавления одного или нескольких кодонов к кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты;

"мутация делеции" одной или нескольких аминокислот из-за делеции одного или нескольких кодонов в кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты;

"мутация сдвига рамки считывания", приводящая к трансляции последовательности нуклеиновой кислоты в другой рамке считывания ниже мутации. Мутация сдвига рамки считывания может иметь различные причины, такие как вставка, делеция или дупликация одного или нескольких нуклеотидов.

В табл. 1 указана длина белка IND Arabidopsis в SEQ ID NO: 10, кодирующей ДНК IND Arabidopsis в SEQ ID NO: 9, и белков IND-A1 и IND-C1 Brassica napus в SEQ ID NO: 2 и 6 и SEQ ID NO: 4 и 8, соответственно; положение доменов bHLH в белках IND-A1 и IND-C1 Brassica napus на основании указанного положения домена pfam PF00010, домена smart SM00353, домена prosite PS50888 и домена superfam G3D.4.10.280.10 или SSF47459 белка IND Arabidopsis согласно базе данных The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/>; локус At4g00120.1, содержание которой приведено в качестве ссылки; SEQ ID NO: 10); положение доменов bHLH и консервативных аминокислот в белках IND-A1 и IND-C1 Brassica napus на основании указанного положения домена bHLH и консервативных аминокислот в белке IND Arabidopsis согласно Heim et al. (2003, Mol. Biol. Evol. 20, 735-747), согласно Toledo-Ortiz et al. (2003, Plant Cell 15: 1749-1770), и согласно Liljegren et al. (2004, Cell, 116, 843-853), содержание которых приведено в настоящем документе в качестве ссылки; как дополнительно описано в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052), содержание которой приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

Таблица 1. Белки IND - области и положения аминокислот (АК)

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



H2	Heim <i>et al.</i>	153-174	457-523	152-173	165-186
	Toledo-Ortiz <i>et al.</i>	153-167	457-501	152-166	165-179
	Liljegren <i>et al.</i>	153-167	457-501	152-166	165-179
<u>Консервативные</u> <u>АК</u>	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
<u>в ind</u>	<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>	Вставка после 61	Вставка 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.

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

Таким образом, один вариант осуществления относится к частично нокаутированным мутантным последовательностям нуклеиновой кислоты IND, содержащим одну или несколько из любых типов мутаций, описанных выше. Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированным последовательностям ind, содержащим одну или несколько СТОП-кодон- (нонсенс-) мутаций, одну или несколько миссенс-мутаций и/или одну или несколько мутаций сдвига рамки считывания. Любая из вышеуказанных мутантных последовательностей нуклеиновой кислоты представлена в чистом виде (в виде-

ленной форме), как представлены растения и части растений, эндогенно содержащие такие последовательности. В таблицах в этом документе ниже описаны наиболее предпочтительные аллели ind, и депозиты семян *Brassica napus*, содержащие один или несколько аллелей ind, депонированы, как указано.

Нонсенс-мутация в аллеле IND, как применяют в настоящем документе, представляет собой мутацию в аллеле IND, при которой один или несколько СТОП-кодонов трансляции введено в кодирующую ДНК и соответствующую последовательность мРНК соответствующего аллеля IND дикого типа. СТОП-кодоны трансляции представляют собой TGA (UGA в мРНК), TAA (UAA) и TAG (UAG). Таким образом, любая мутация (делеция, вставка или замена), приводящая к образованию СТОП-кодона в рамке считывания в кодирующей последовательности, может приводить к терминации трансляции и усечению аминокислотной цепи. Один вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному аллелю IND, содержащему нонсенс-мутацию, где СТОП-кодон в рамке считывания введен в последовательность кодонов IND посредством замены одного нуклеотида, такой как мутация CAG до TAG, TGG до TAG, TGG до TGA, или CAA до TAA. Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному аллелю IND, содержащему нонсенс-мутацию, где СТОП-кодон в рамке считывания введен в последовательность кодонов IND посредством двойных замен нуклеотидов, таких как мутация CAG до TAA, TGG до TAA, или CGG до TAG или TGA. Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному аллелю IND, содержащему нонсенс-мутацию, где СТОП-кодон в рамке считывания введен в последовательность кодонов IND посредством тройных замен нуклеотидов, таких как мутация CGG до TAA. В усеченном белке отсутствуют аминокислоты, кодируемые кодирующей ДНК ниже мутации (т.е. С-концевая часть белка IND), и сохраняются аминокислоты, кодируемые кодирующей ДНК выше мутации (т.е. N-концевая часть белка IND). Один вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному аллелю IND, содержащему нонсенс-мутацию, присутствующую где-либо до консервативного остатка Leu домена H2 (в положении 56 в консенсусной последовательности домена bHLH, как описано в Heim et al., 2003, см. табл. 1), так что, по меньшей мере, консервативный остаток Leu отсутствует. Чем более усеченным является мутантный белок IND по сравнению с белком IND дикого типа, тем скорее усечение может приводить к значительно уменьшенной активности белка IND.

Считают, что, чтобы мутантный белок IND сохранял некоторую биологическую активность, он должен, по меньшей мере, содержать ДНК-связывающий (b) домен. Таким образом, другой вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному аллелю IND, содержащему нонсенс-мутацию, приводящую к усеченному белку из менее приблизительно 170 аминокислот (с отсутствием консервативного Leu), менее приблизительно 150 аминокислот (с отсутствием домена H2), менее приблизительно 145 аминокислот (с отсутствием доменов L и H2) или менее приблизительно 130 аминокислот (с отсутствием домена HLH) (см. табл. 1).

В таблицах ниже описан ряд возможных нонсенс-мутаций в последовательностях IND *Brassica napus*, представленных в настоящем документе.

Таблица 2a. Потенциальные СТОП-кодон-мутации в IND-A1 (SEQ ID NO: 1)

Положение аминокислоты	Положение нуклеотида	Кодон дикого типа → мутантный кодон	Аминокислота дикого типа → мутантная аминокислота
25	74	tgg → tag	TRP → СТОП
	75	tgg → tga	TRP → СТОП
	74+75	tgg → taa	TRP → СТОП
57	169	cag → tag	GLN → СТОП
	169+171	cag → taa	GLN → СТОП
91	271	caa → taa	GLN → СТОП
98	292	cag → tag	GLN → СТОП
	292+294	cag → taa	GLN → СТОП
122	364	cag → tag	GLN → СТОП
	364+366	cag → taa	GLN → СТОП
128	382+383	cgg → tag	ARG → СТОП
	382+384	cgg → tga	ARG → СТОП
	382+383+384	cgg → taa	ARG → СТОП

138	412+413	cgg → tag	ARG → СТОП
	412+414	cgg → tga	ARG → СТОП
	412+413+414	cgg → taa	ARG → СТОП
168	502+503	cgg → tag	ARG → СТОП
	502+504	cgg → tga	ARG → СТОП
	502+503+504	cgg → taa	ARG → СТОП
169	505	cag → tag	GLN → СТОП
	505+507	cag → taa	GLN → СТОП
181	542	tgg → tag	TRP → СТОП
	543	tgg → tga	TRP → СТОП
	542+543	tgg → taa	TRP → СТОП

Таблица 2b. Потенциальные СТОП-кодон-мутации в IND-C1 (SEQ ID NO: 3)

Положение аминокислоты	Положение нуклеотида	Кодон дикого типа → мутантный кодон	Аминокислота дикого типа → мутантная аминокислота
41	122	tgg → tag	TRP → СТОП
	123	tgg → tga	TRP → СТОП
	122+123	tgg → taa	TRP → СТОП
50	148	caa → taa	GLN → СТОП
73	271	cag → tag	GLN → СТОП
	271+272	cag → taa	GLN → СТОП
104	310	caa → taa	GLN → СТОП
111	331	cag → tag	GLN → СТОП
	331+333	cag → taa	GLN → СТОП
135	403	cag → tag	GLN → СТОП
	403+405	cag → taa	GLN → СТОП
141	421+422	cgg → tag	ARG → СТОП
	421+423	cgg → tga	ARG → СТОП
	421+422+423	cgg → taa	ARG → СТОП
151	451+452	cgg → tag	ARG → СТОП
	451+453	cgg → tga	ARG → СТОП
	451+452+453	cgg → taa	ARG → СТОП
181	541+542	cgg → tag	ARG → СТОП
	541+543	cgg → tga	ARG → СТОП
	541+542+543	cgg → taa	ARG → СТОП
182	544	cag → tag	GLN → СТОП
	544+546	cag → taa	GLN → СТОП
187	559	cag → tag	GLN → СТОП
	559+561	cag → taa	GLN → СТОП
191	571	cag → tag	GLN → СТОП
	571+573	cag → taa	GLN → СТОП

Очевидно, что мутации не являются ограниченными показанными в вышеуказанных таблицах, и понятно, что аналогичные СТОП-мутации могут присутствовать в аллелях ind, отличных от показанных в списке последовательностей и со ссылкой на таблицы выше.

Миссенс-мутация в аллеле IND, как применяют в настоящем документе, представляет собой любую мутацию (делецию, вставку или замену) в аллеле IND, при которой один или несколько кодонов изменяются в последовательности кодирующей ДНК и соответствующей мРНК соответствующего аллеля IND дикого типа, приводя к замене одной или нескольких аминокислот в белке IND дикого типа на одну или несколько других аминокислот в мутантном белке IND. Один вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному аллелю IND, содержащему миссенс-мутацию, приводящую к замене остатка валина (Val) в положении 124 белка IND в SEQ ID NO: 2, или в последовательности, в основном сходной с ней, в частности, на остаток метионина (Met), например аллель ind-a1-EMS06 (табл. 3a). Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному аллелю IND, содержащему миссенс-мутацию, приводящую к замене остатка глицина (Gly) в положении 146 белка IND в SEQ ID NO: 2, или в последовательности, в основном сходной с ней, в частности на остаток серина (Ser), например аллель ind-a1-EMS09 (табл. 3a). Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному аллелю IND, содержащему миссенс-мутацию, приводящую к замене остатка аланина (Ala) в положении 159 белка IND в SEQ ID NO: 2, или в последовательности, в основном сходной с ней, в частности на остаток валина (Val), например, аллель ind-a1-EMS13 (табл. 3a). Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному аллелю IND, содержащему миссенс-мутацию, приводящую к замене остатка треонина (Thr) в положении 136 белка IND в SEQ ID NO: 4, или в последовательности, в основном сходной с ней, в частности на остаток метионина (Met), например, аллель ind-c1-EMS08 (табл. 3b). Следующий вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному аллелю IND, содержащему миссенс-мутацию, приводящую к замене остатка аланина (Ala) в положении 139 белка IND in SEQ ID NO: 4 или в последовательности, в основном сходной с ней, в частности на остаток треонина (Thr), например аллель ind-c7-EMS09 (табл. 3b). Дополнительный вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному аллелю IND, содержащему миссенс-мутацию, приводящую к замене остатка аргинина (Arg) в положении 142 белка IND в SEQ ID NO: 4, или в последовательности, в основном сходной с ней, в частности, на остаток цистеина (Cys), например аллель ind-c1-EMS04 (табл. 3b). Эталонные семена, содержащие аллели ind-a1-EMS06, ind-a1-EMS09, ind-a1-EMS13, ind-c1-EMS08, ind-c1-EMS09 и ind-c1-EMS04 в гомозиготном состоянии, депонированы в NCIMB Limited (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Scotland, AB21 9YA, UK) 7 июля 2008 г. под инвентарными номерами NCIMB 41570, NCIMB 41571, NCIMB 41572, NCIMB 41573, NCIMB 41574 и NCIMB 41575 соответственно.

Таблица 3a. Миссенс-мутации в IND-A1

Положение аминокислоты	Положение нуклеотида		Кодон дикого типа → мутантный кодон	Аминокислота дикого типа → мутантная аминокислота	Наименование аллеля	Номер депозита
SEQ ID: 2/6	SEQ ID: 1	SEQ ID: 5				
124	370	930	<u>G</u> tg → atg	VAL → MET	ind-a1-EMS06	NCIMB 41570
146	436	996	<u>G</u> gc → agc	GLY → SER	ind-a1-EMS09	NCIMB 41571
159*	476	1036	G <u>g</u> c → gtc	ALA → VAL	ind-a1-EMS13	NCIMB 41572

Таблица 3b. Миссенс-мутации в IND-C1 (SEQ ID NO: 3)

Положение аминокислоты	Положение нуклеотида		Кодон дикого типа → мутантный кодон	Аминокислота дикого типа → мутантная аминокислота	Наименование аллеля	Номер депозита
SEQ ID: 4/8	SEQ ID: 3	SEQ ID: 7				
136	407	903	acc → atg	THR → MET	ind-c1-EMS08	NCIMB 41573
139*	415	911	gct → act	ALA → THR	ind-c1-EMS09	NCIMB 41574
142*	424	920	cgt → tgt	ARG → CYS	ind-c1-EMS04	NCIMB 41575

Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному аллелю IND, содержащему миссенс-мутацию, кодирующему белок IND, где одна или несколько консервативных аминокислот, указанных выше или в табл. 1, заменена/заменены, например, частично нокаутированными мутантными аллелями IND ind-a1-EKS13, ind-c1-EMS04 и ind-c1-EMS09 (отмечены \* в табл. 3). Как описано в Heim et al. (2003, Mol. Biol. Evol. 20, 735-747), Toledo-Ortiz et al. (2003, Plant Cell 15: 1749-1770), Liljegren et al. (2004, Cell, 116, 843-853), и WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052), некоторые из консервативных аминокислот являются более критическими для биологической активности белка IND, чем другие. Таким образом, например, миссенс-мутации, приводящие например, к замене аминокислот в положениях 5, 9 (например, ind-c1-EMS09) и 13 или в положениях 10 (например, ind-a1-EMS05) и 12 (например, ind-c1-EMS04) консенсусной последовательности домена bHLH, определенной Heim et al. (выше), более вероятно приводят к значительно уменьшенной активности, из-за сниженной способности белка IND связывать ДНК-мишень. Подобным образом, миссенс-мутации, приводящие, например, к замене аминокислот в положениях 16, 20, 23, 27 в спирали 1 или в положениях 36, 39, 43, 49 (например, ind-a1-EMS13), 53 и 56 в спирали 2 консенсусной последовательности домена bHLH, определенной Heim et al. (выше), более вероятно приводят к значительно уменьшенной активности из-за сниженной способности белка IND к димеризации.

В другом варианте осуществления частично нокаутированный мутантный аллель IND, содержащий миссенс-мутацию, который можно применять по изобретению, представляет собой аллель IND, содержащий миссенс-мутацию, соответствующую миссенс-мутации в частично нокаутированных аллелях ind-1 Arabidopsis (Liljegren et al., 2004, выше) (см. табл. 1).

Мутация сдвига рамки считывания в аллеле IND, как применяют в настоящем документе, представляет собой мутацию (делецию, вставку, дупликацию и т.п.) в аллеле IND, которая приводит к трансляции последовательности нуклеиновой кислоты в другой рамке считывания ниже мутации.

Аминокислотные последовательности по изобретению.

Представлены частично нокаутированные мутантные аминокислотные последовательности IND (т.е. аминокислотные последовательности IND, содержащие одну или несколько мутаций, приводящих к значительно уменьшенной биологической активности белка IND) из Brassicaceae, в частности из вида Brassica, особенно из Brassica napus, но также из других сельскохозяйственных видов Brassica. Например, вид Brassica, содержащий геном А и/или С, может кодировать различные аминокислоты IND-A1 или IND-C1, которые являются в основном сходными с новыми частично нокаутированными мутантными белками IND по изобретению. Кроме того, способы мутагенеза можно использовать для получения мутаций в аллелях IND дикого типа, таким образом получая мутантные аллели, которые могут кодировать дополнительные мутантные белки IND, в основном сходные с частично нокаутированными мутантными белками IND по настоящему изобретению. Один вариант осуществления относится к мутантным аминокислотным последовательностям IND в растении Brassica (т.е. эндогенным). Однако выделенные аминокислотные последовательности IND (например, выделенные из растения или полученные синтетически), так же как их варианты и фрагменты любого из них, также представлены в настоящей заявке.

Аминокислотные последовательности, в основном сходные с новыми частично нокаутированными мутантными белками IND по настоящему изобретению, можно получать заменой аминокислот в частично нокаутированных аминокислотных последовательностях IND по настоящему изобретению на другие аминокислоты, обладающие сходными свойствами (такими как сходная гидрофобность, гидрофильность, антигенность, склонность формировать или разрушать структуры α-спирали или структуры β-листа). Таблицы консервативных замен хорошо известны в данной области (см., например Creighton (1984) Proteins. W.H. Freeman and Company и табл. 4 настоящей патентной заявки).

Таблица 4. Примеры консервативных замен аминокислот

Остаток	Консервативные замены	Остаток	Консервативные замены
Ala	Ser	Leu	Ile, Val
Arg	Lys	Lys	Arg, Gln
Asn	Gln, His	Met	Leu, Ile
Asp	Glu	Phe	Met, Leu, Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr, Gly
Cys	Ser	Thr	Ser, Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp, Phe
His	Asn, Gln	Val	Ile, Leu
Ile	Leu, Val		

Новые частично нокаутированные мутантные аминокислотные последовательности из белков IND дикого типа IND-A1 и IND-C1 выделены из *Brassica napus*. Последовательности IND дикого типа, как описано в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052), показаны в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4, в то время как новые частично нокаутированные мутантные последовательности IND из этих последовательностей, и из последовательностей, в основном сходных с этими, описаны в настоящем документе ниже и в примерах, по отношению к последовательностям IND дикого типа. Как описано выше, белки IND дикого типа *Brassica napus* имеют длину приблизительно 185-210 аминокислот и содержат ряд структурных и функциональных доменов.

"Аминокислотные последовательности IND-A1" или "аминокислотные последовательности вариантов IND-A1" по изобретению представляют собой аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2. Эти аминокислотные последовательности можно обозначать также как "в основном сходные" или "по существу идентичные" с последовательностями IND, представленными в списке последовательностей.

"Аминокислотные последовательности IND-C1" или "аминокислотные последовательности вариантов IND-C1" по изобретению представляют собой аминокислотные последовательности, обладающие по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности с 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 можно обозначать также как "в основном сходные" или "по существу идентичные" с последовательностями IND, представленными в списке последовательностей.

Таким образом, изобретение относится к новым, частично нокаутированным мутантным последовательностям из аминокислотных последовательностей дикого типа функциональных белков IND-A1 и IND-C1, включая их варианты и фрагменты (как определено далее ниже), при этом мутация в аминокислотной последовательности предпочтительно приводит к значительному уменьшению биологической активности белка IND по сравнению с биологической активностью соответствующего белка IND дикого типа. Значительное уменьшение биологической активности белка IND относится в настоящем документе к уменьшению активности связывания ДНК, способности к димеризации и/или активности регуляции транскрипции белка IND, так что устойчивость к растрескиванию стручков растения, экспрессирующего мутантный белок IND, увеличена по сравнению с растением, экспрессирующим соответствующий белок IND дикого типа, по сравнению с устойчивостью к растрескиванию стручков соответствующего растения дикого типа.

В настоящей заявке представлены как эндогенные, так и выделенные аминокислотные последовательности. Представлены также фрагменты аминокислотной последовательности IND и аминокислотные последовательности вариантов IND, определенные выше. "Фрагмент" аминокислотной последовательности IND или ее варианта (как определено) может иметь различную длину, например по меньшей мере 10, 12, 15, 18, 20, 50, 100, 150, 175, 180 непрерывных аминокислот из последовательности IND (или из варианта последовательности).

Аминокислотные последовательности функциональных белков IND.

Аминокислотные последовательности, показанные в списке последовательностей, представляют собой функциональные белки IND дикого типа из *Brassica napus*. Таким образом, эти последовательности являются эндогенными для растений *Brassica napus*, из которых они выделены. Можно проводить скрининг других сельскохозяйственных видов, сортов, генеалогических линий или диких образцов *Brassica*

по другим функциональным белкам IND с такими же аминокислотными последовательностями или их вариантами, как описано выше.

Кроме того, понятно, что аминокислотные последовательности IND и их варианты (или фрагменты любого из них) можно идентифицировать *in silico*, посредством скрининга баз данных аминокислот в основном по сходным последовательностям. Представлены также фрагменты аминокислотных молекул по изобретению. Фрагменты включают в себя аминокислотные последовательности домена bHLH, или более мелкие фрагменты, содержащие часть домена bHLH, такие как основной домен или домен HLH и т.д.

Аминокислотные последовательности мутантных белков IND.

Изобретение относится к аминокислотным последовательностям, содержащим одну или несколько делеций, вставок или замен аминокислот относительно аминокислотных последовательностей IND дикого типа, показанных в SEQ ID NO: 2 и 4 из списка последовательностей, где мутация(мутации) в аминокислотной последовательности приводит к значительно уменьшенной биологической активности, т.е. частично нокаутированной биологической активности, кодируемого белка IND относительно белка дикого типа, так же как к фрагментам таких мутантных аминокислотных молекул. Такие мутантные аминокислотные последовательности можно получать и/или идентифицировать с использованием различных известных способов, как описано выше. И в этом случае такие аминокислотные молекулы представлены как в эндогенной форме, так и в выделенной форме.

Как описано выше, в основном, любая мутация в аминокислотных последовательностях IND дикого типа, которая приводит к белку IND, содержащему по меньшей мере одну вставку, делецию и/или замену аминокислоты относительно белка IND дикого типа, может приводить к значительному уменьшению или отсутствию биологической активности. Однако понятно, что конкретные мутации в белке IND более вероятно приводят к полному прекращению биологической активности белка IND, такие как мутации, приводящие к усеченным белкам, при которых значительные части функциональных доменов, таких как ДНК-связывающий домен ("b"), домен для димеризации ("HLH"), и/или аминокислоты, которые являются важными для регуляции транскрипции (см. табл. 1), отсутствуют, или мутации, при которых конкретные критические аминокислотные остатки в этих доменах, такие как аминокислоты Gln (Q), Ala (A) и Arg (R) в положении 5, 9, и 13 или основные аминокислотные остатки (в частности остатки Arg (R)) в положениях 10 и 12 консенсусной последовательности домена bHLH, определенного Heim et al. (выше; соответствующие положениям 123, 127 и 131, и 128 и 130, соответственно, в SEQ ID NO: 10, см. табл. 1) отсутствуют или заменены, предпочтительно, не сходными или не консервативными аминокислотами, в то время как другие мутации в белке, более вероятно, приводят к значительному уменьшению биологической активности белка IND, такие как мутации, приводящие к заменам конкретных аминокислот, например, консервативных аминокислот, указанных в табл. 1, вызывающим менее эффективное связывание ДНК, менее эффективную димеризацию и/или менее эффективную регуляцию транскрипции без полного прекращения биологической активности кодируемого белка IND.

Таким образом, один вариант осуществления относится к частично нокаутированным мутантным белкам IND, содержащим одну или несколько мутаций делеции или вставки, при которых делеция(делеции) или вставка(вставки) приводит(приводят) к мутантному белку, обладающего значительно уменьшенной активностью *in vivo*. Такие мутантные белки IND представляют собой белки IND, где по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 150, 175, 180 или несколько аминокислот deletированы или вставлены по сравнению с белком IND дикого типа, при этом делеция(делеции) или вставка(вставки) приводит(приводят) к мутантному белку, обладающему значительно уменьшенной активностью *in vivo*.

Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированным мутантным белкам IND, которые являются усеченными, при этом усечение приводит к мутантному белку, обладающему значительно уменьшенной активностью *in vivo*. Такие усеченные белки IND представляют собой белки IND, у которых отсутствуют функциональные домены в С-концевой части соответствующего белка IND дикого типа и у которых сохраняется N-концевая часть соответствующего белка IND дикого типа. Таким образом, один вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному белку IND, содержащему N-концевую часть соответствующего белка IND дикого типа вплоть до, но не включительно, консервативного остатка Leu домена H2 (в положении 56 в консенсусной последовательности домена bHLH, как описано в Heim et al., 2003, см. выше). Чем более усеченным является мутантный белок IND по сравнению с белком IND дикого типа, тем скорее усечение может приводить к значительно уменьшенной активности белка IND. Считают, что, чтобы мутантный белок IND сохранял некоторую биологическую активность, он должен, по меньшей мере, содержать ДНК-связывающий (b) домен. Таким образом, другой вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному белку IND, содержащему N-концевую часть соответствующего белка IND дикого типа с отсутствием части или всего второго домена H, и/или с отсутствием части или всего домена L, и/или с отсутствием части или всего первого домена H (см. табл. 1).

Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированным мутантным белкам IND, содержащим одну или несколько мутаций замены, при этом замена(замены) приводит(приводят) к мутантному белку, обладающему значительно уменьшенной активностью *in vivo*. Один вариант осуществ-



ления относится к частично нокаутированному мутантному белку IND, содержащему мутацию замены, приводящую к замене остатка валина (Val) в положении 124 белка IND в SEQ ID NO: 2 или в последовательности, в основном сходной с ней, в частности на остаток метионина (Met), так, как в частично нокаутированном мутантном белке IND, кодируемом аллелем ind-a1-EKS06 (табл. 3a). Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному белку IND, содержащему мутацию замены, приводящую к замене остатка глицина (Gly) в положении 146 белка IND в SEQ ID NO: 2 или в последовательности, в основном сходной с ней, в частности на остаток серина (Ser), так, как в частично нокаутированном мутантном белке IND, кодируемом аллелем ind-a1-EMS09 (табл. 3a). Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному белку IND, содержащему мутацию замены, приводящую к замене остатка аланина (Ala) в положении 159 белка IND в SEQ ID NO: 2 или в последовательности, в основном сходной с ней, в частности на остаток валина (Val), так, как в частично нокаутированном мутантном белке IND, кодируемом аллелем ind-a1-EMS13 (табл. 3a). Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному белку IND, содержащему мутацию замены, приводящую к замене остатка треонина (Thr) в положении 136 белка IND в SEQ ID NO: 4 или в последовательности, в основном сходной с ней, в частности на остаток метионина (Met), так, как в частично нокаутированном мутантном белке IND, кодируемом аллелем ind-c1-EMS08 (табл. 3b). Следующий вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному белку IND, содержащему мутацию замены, приводящую к замене остатка аланина (Ala) в положении 139 белка IND в SEQ ID NO: 4, или в последовательности, в основном сходной с ней, в частности на остаток треонина (Thr), так, как в частично нокаутированном мутантном белке IND, кодируемом аллелем ind-c1-EMS09 (табл. 3b). Дополнительный вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному белку IND, содержащему мутацию замены, приводящую к замене остатка аргинина (Arg) в положении 142 белка IND в SEQ ID NO: 4, или в последовательности, в основном сходной с ней, в частности, на остаток цистеина (Cys), так, как в частично нокаутированном мутантном белке IND, кодируемом аллелем ind-c1-EMS04 (табл. 3b).

Другой вариант осуществления относится к частично нокаутированному мутантному белку IND, содержащему мутацию замены, приводящую к замене консервативных аминокислотных остатков, как указано выше или в табл. 1, так, как в частично нокаутированном мутантном белке IND, кодируемом ind-a1-EMS13, ind-c1-EMS04 или ind-c1-EKS09 (отмечены \* в табл. 3).

Способы по изобретению.

В другом аспекте изобретение относится к способам получения и селекции растений с высвобождением семян растрескиванием, и их клеток, частей, семян или потомства, содержащих по меньшей мере один частично и/или по меньшей мере один полностью нокаутированный аллель ind. В частности, представлены способы получения и селекции растений Brassica, содержащих по меньшей мере два гена IND, в частности, растений Brassica napus и их клеток, частей, семян или потомства, содержащих по меньшей мере один частично и/или по меньшей мере один полностью нокаутированный аллель ind по меньшей мере в одном из по меньшей мере двух различных локусов IND в геноме, например по меньшей мере в одном из двух различных локусов генов IND-A1 и IND-C1 Brassica, и установления различий между присутствием полностью нокаутированных аллелей ind, частично нокаутированных аллелей ind и аллелей IND дикого типа в растении с высвобождением семян растрескиванием или в части растения. Таким образом, представлены способы (такие как мутагенез и/или селекция с использованием маркера) получения и/или идентификации частично нокаутированных аллелей ind и/или полностью нокаутированных аллелей ind, или растений с высвобождением семян растрескиванием, или частей растений, содержащих такие аллели ind, и комбинации подходящим образом частично нокаутированных аллелей ind и/или полностью нокаутированных аллелей ind, и/или различных типов частично нокаутированных аллелей ind, и/или полностью нокаутированных аллелей ind в одном растении с высвобождением семян растрескиванием для изменения свойств растрескивания плода растений, в частности, для уменьшения осыпания семян, или замедления осыпания семян до окончания сбора урожая, при сохранении в то же самое время агрономически релевантной обмолачиваемости стручков.

Частично и полностью нокаутированные мутантные аллели ind по изобретению можно получать (например, индуцировать посредством мутагенеза) и/или идентифицировать с использованием ряда способов, общепринятых в данной области, например, с использованием способов на основе ПЦР для амплификации части или всей геномной ДНК или кДНК ind.

После мутагенеза растения выращивают из обработанных семян, или регенерируют из обработанных клеток с использованием известных способов. Например, подвергнутые мутагенезу семена можно высевать в соответствии с общепринятыми способами выращивания, и после самоопыления на растениях образуются семена. Альтернативно, можно выделять двойные гаплоидные проростки из обработанных клеток микроспор или пыльцы, чтобы сразу формировать гомозиготные растения, например, как описано в 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, можно собирать и проводить скрининг по присутствию мутантных аллелей IND, с использованием способов, обще-

принятых в данной области, например, способы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) (амплификация аллелей ind) или способы на основе гибридизации, например анализ Саузерн-блоттингом, скрининг библиотеки ВАС, и т.п., и/или прямое секвенирование аллелей ind. Для скрининга по присутствию точечных мутаций (так называемых однонуклеотидных полиморфизмов или SNP) в мутантных аллелях IND, можно использовать способы детекции SNP, общепринятые в данной области, например, способы на основе олиголигирования, способы на основе удлинения одного основания или способы на основе различий в участках рестрикции, такие как TILLING.

Как описано выше, мутагенез (спонтанный, также как и индуцированный) специфического аллеля IND приводит к присутствию одного или нескольких делетированных, вставленных или замененных нуклеотидов (далее в настоящем документе называемых "область мутации") в полученном мутантном аллеле IND. Мутантный аллель IND можно, таким образом, характеризовать по положению и конфигурации одного или нескольких делетированных, вставленных или замененных нуклеотидов в аллеле IND дикого типа. Участок в аллеле IND дикого типа, где один или несколько нуклеотидов вставлены, делетированы, или заменены, соответственно, в настоящем документе обозначают также как "область или последовательность мутации". "5'- или 3'-фланкирующая область или последовательность", как применяют в настоящем документе, обозначает область или последовательность ДНК в аллеле IND, мутантном (или соответствующем дикого типа), из по меньшей мере 20 п.о., предпочтительно по меньшей мере 50 п.о., по меньшей мере 750 п.о., по меньшей мере 1500 п.о., и вплоть до 5000 п.о. ДНК, отличную от ДНК, содержащей один или несколько делетированных, вставленных или замененных нуклеотидов, предпочтительно, ДНК из аллеля IND, мутантного (или соответствующего дикого типа), локализованную либо непосредственно выше и вплотную к ("5'-фланкирующая область или последовательность") или непосредственно ниже и вплотную к ("3'-фланкирующая область или последовательность") области мутации в мутантном аллеле IND (или в соответствующем аллеле IND дикого типа). "Область соединения", как применяют в настоящем документе, обозначает область ДНК в аллеле IND, мутантном (или соответствующем дикого типа), где область мутации и 5'- или 3'-фланкирующая область соединяются друг с другом. "Последовательность, перекрывающая область соединения области мутации и 5'- или 3'-фланкирующей области", таким образом, содержит мутантную последовательность, также как и фланкирующую последовательность, примыкающую к ней.

Средства, разработанные для идентификации специфического мутантного аллеля IND или растения, или растительного материала, содержащего специфический мутантный аллель IND, или продуктов, содержащих растительный материал, содержащий специфический мутантный аллель IND, основаны на специфических геномных характеристиках специфического мутантного аллеля IND по сравнению с геномными характеристиками соответствующего аллеля IND дикого типа, например специфическая рестрикционная карта геномной области, содержащей область мутации, молекулярные маркеры или последовательность мутантной и/или фланкирующей области.

После секвенирования мутантного аллеля IND можно разработать праймеры и зонды, которые специфически узнают последовательность в 5'-фланкирующей, 3'-фланкирующей и/или мутантной областях мутантного аллеля IND в нуклеиновой кислоте (ДНК или РНК) образца посредством способа молекулярной биологии. Например, можно разработать способ ПЦР для идентификации мутантного аллеля IND в биологических образцах (таких как образцы растений, растительного материала или продуктов, содержащих растительный материал). Такая ПЦР основана по меньшей мере на двух специфических "праймерах": одном, узнающем последовательность внутри 5'- или 3'-фланкирующей области мутантного аллеля IND, и другом, узнающем последовательность внутри 3'- или 5'-фланкирующей области мутантного аллеля IND, соответственно; или одним, узнающем последовательность внутри 5'- или 3'-фланкирующей области мутантного аллеля IND, и другом, узнающем последовательность внутри области мутации мутантного аллеля IND; или одним, узнающем последовательность внутри 5'- или 3'-фланкирующей области мутантного аллеля IND, и другом, узнающем последовательность, перекрывающую область соединения 3'- или 5'-фланкирующей области и области мутации специфического мутантного аллеля IND (как описано далее ниже), соответственно.

Праймеры, предпочтительно, обладают последовательностью между 15 и 35 нуклеотидами, которые при оптимизированных условиях ПЦР "специфически узнают" последовательность внутри 5'- или 3'-фланкирующей области, последовательность внутри области мутации или последовательность, перекрывающую область соединения 3'- или 5'-фланкирующей и мутантной области специфического мутантного аллеля IND, так что специфический фрагмент ("специфический фрагмент мутантного IND" или избирательный ампликон) амплифицируют из образца нуклеиновой кислоты, содержащего специфический мутантный аллель IND. Это означает, что только мутантный аллель-мишень IND, а не какие-либо другие последовательности в геноме растения, амплифицируются в оптимизированных условиях ПЦР.

Праймеры для ПЦР, подходящие по изобретению, могут являться следующими:

олигонуклеотиды длиной в диапазоне от 17н. до приблизительно 200н., содержащие нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 17 последовательных нуклеотидов, предпочтительно 20 последовательных нуклеотидов, выбранных из 5'- или 3'-фланкирующей последовательности специфического мутантного аллеля IND или комплементарной ей последовательности (т.е., например, последовательно-

сти, 5'- или 3'-фланкирующей один или несколько нуклеотидов, делетированных, вставленных или замененных в мутантных аллелях IND по изобретению, такой как последовательности, 5'- или 3'-фланкирующей нонсенс-, миссенс-мутации или мутации сдвига рамки считывания, описанные выше, или последовательности, 5'- или 3'-фланкирующей СТОП-кодон-мутации, указанные в таблицах выше или мутации замены, указанные выше, или комплементарной ей последовательности) (праймеры, узнающие 5'-фланкирующие последовательности); или

олигонуклеотиды длиной в диапазоне от 17н. до приблизительно 200н., содержащие нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 17 последовательных нуклеотидов, предпочтительно, 20 нуклеотидов, выбранных из последовательности области мутации специфического мутантного аллеля IND или комплементарной ей последовательности (т.е., например, последовательности нуклеотидов, вставленных или замененных в генах IND по изобретению, или комплементарной ей последовательности) (праймеры, узнающие мутантные последовательности).

Праймеры, разумеется, могут быть длиннее упомянутых 17 последовательных нуклеотидов и могут, например, иметь длину 18, 19, 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200н. или даже длиннее. Праймеры могут полностью состоять из нуклеотидной последовательности, выбранной из упомянутых нуклеотидных последовательностей фланкирующих и мутантных последовательностей. Однако нуклеотидная последовательность праймеров на их 5'-конце (т.е. вне 3'-локализованных 17 последовательных нуклеотидов) является менее критической. Таким образом, 5'-последовательность праймеров может состоять из нуклеотидной последовательности, выбранной из фланкирующих или мутантных последовательностей, соответствующим образом, но может содержать несколько (например, 1, 2, 5, 10) неправильно спаривающихся оснований. 5'-Последовательность праймеров может полностью состоять из нуклеотидной последовательности, не родственной фланкирующим или мутантным последовательностям, например, нуклеотидной последовательности, представляющей участки узнавания рестрикционных ферментов. Такие не родственные фланкирующим последовательностям ДНК последовательности с неправильно спаривающимися основаниями, предпочтительно не длиннее 100, более предпочтительно не длиннее 50 или даже 25 нуклеотидов.

Более того, подходящие праймеры могут содержать нуклеотидную последовательность или состоять из нуклеотидной последовательности, перекрывающей область соединения фланкирующих и мутантных последовательностей (т.е., например, область соединения последовательности, 5'- или 3'-фланкирующей один или несколько нуклеотидов, делетированных, вставленных или замененных в мутантных аллелях IND по изобретению, и последовательности из одного или нескольких нуклеотидов, вставленных или замененных, или последовательности, 3'- или 5'-фланкирующей, соответственно, один или несколько делетированных нуклеотидов, такую как область соединения последовательности, 5'- или 3'-фланкирующей нонсенс-, миссенс-мутации или мутации сдвига рамки считывания в генах IND по изобретению, описанных выше, и последовательности нонсенс-, миссенс-мутаций или мутаций сдвига рамки считывания, или область соединения последовательности, 5'- или 3'-фланкирующей потенциальные СТОП-кодон-мутации, как указано в таблицах выше, или мутации замены, указанные выше, и последовательности потенциальных СТОП-кодон-мутаций или мутаций замены, соответственно), при условии, что нуклеотидная последовательность не происходит исключительно либо из области мутации, либо из фланкирующих областей.

Специалисту в данной области также сразу понятно, что правильно подобранные пары праймеров для ПЦР не должны также содержать последовательности, комплементарные друг другу.

Для целей по изобретению "последовательность, комплементарная нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: X" представляет собой нуклеотидную последовательность, которую можно получить из представленной нуклеотидной последовательности посредством замены нуклеотидов на комплементарные им нуклеотиды согласно правилам Чаргаффа ( $A \leftrightarrow T$ ;  $G \leftrightarrow C$ ) и считывания последовательности в направлении от 5' до 3', т.е. в направлении, обратном представленной нуклеотидной последовательности.

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

Как применяют в настоящем документе, "нуклеотидная последовательность из SEQ ID NO: Z от положения X до положения Y" обозначает нуклеотидную последовательность, включая оба конечных нуклеотида.

Предпочтительно, амплифицированный фрагмент имеет длину между 50 и 1000 нуклеотидами, например длину между 50 и 500 нуклеотидами, или длину между 100 и 350 нуклеотидами. Специфические праймеры могут обладать последовательностью, на 80-100% идентичной последовательности внутри 5'-или 3'-фланкирующей области, последовательности внутри области мутации, или последовательности, перекрывающей область соединения 3'- или 5'-фланкирующей и мутантной области специфического мутантного аллеля IND, при условии, что неправильно спаривающиеся нуклеотиды еще позволяют специфическую идентификацию специфического мутантного аллеля IND с помощью этих праймеров в оптимизированных условиях ПЦР. Однако диапазон допустимых неправильно спаривающихся нуклеотидов легко можно определить экспериментально, и они известны специалисту в данной области.

Детекция и/или идентификация "специфического фрагмента мутантного IND" может происходить различными способами, например посредством оценки размера после электрофореза в геле или капиллярного электрофореза или способами детекции на основе флуоресценции. Можно также напрямую секвенировать специфические фрагменты мутантного IND. Другие специфические для последовательности способы детекции амплифицированных фрагментов ДНК также известны в данной области.

Стандартные протоколы ПЦР описаны в данной области, например, в "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2nd Edition, 1999) и других ссылках. Оптимальные условия для ПЦР, включая последовательность специфических праймеров, указана в "протоколе ПЦР-идентификации" для каждого специфического мутантного аллеля IND. Однако понятно, что может потребоваться уточнение ряда параметров в протоколе ПЦР-идентификации до конкретных лабораторных условий, и их можно немного модифицировать для получения сходных результатов. Например, применение другого способа получения ДНК может требовать уточнения, например, использованных количества праймеров, полимеры, концентрации  $MgCl_2$  или условий отжига. Подобным образом, выбор других праймеров может диктовать другие оптимальные условия протокола ПЦР-идентификации. Однако эти уточнения очевидны специалисту в данной области и, более того, подробно описаны в современных руководствах по применению ПЦР, таких как процитированное выше.

Примеры протоколов ПЦР-идентификации для идентификации специфических мутантных аллелей IND описаны в примерах.

Альтернативно, специфические праймеры можно использовать для амплификации специфического фрагмента мутантного IND, который можно использовать в качестве "специфического зонда" для идентификации специфического мутантного аллеля IND в биологических образцах. Приведение нуклеиновой кислоты биологического образца в контакт с зондом в условиях, позволяющих гибридизацию зонда с соответствующим ему фрагментом в нуклеиновой кислоте, приводит к формированию гибрида нуклеиновой кислоты/зонда. Формирование этого гибрида можно детектировать (например, мечением нуклеиновой кислоты или зонда), при этом формирование этого гибрида указывает на присутствие специфического мутантного аллеля IND. Такие способы идентификации на основе гибридизации со специфическим зондом (либо на твердофазном носителе, либо в растворе) описаны в данной области. Специфический зонд, предпочтительно, обладает последовательностью, которая, в оптимизированных условиях, специфически гибридизуется с областью внутри 5'- или 3'-фланкирующей области и/или внутри области мутации специфического мутантного аллеля IND (далее в настоящем документе обозначенной "специфическая область мутантного IND"). Предпочтительно, специфический зонд содержит последовательность из между 10 и 1000 п.о., 50 и 600 п.о., между 100 и 500 п.о., между 150 и 350 п.о., которая является по меньшей мере на 80%, предпочтительно между 80 и 85%, более предпочтительно между 85 и 90%, особенно предпочтительно между 90 и 95%, наиболее предпочтительно между 95% и 100% идентичной (или комплементарной) нуклеотидной последовательности специфической области. Предпочтительно, специфический зонд содержит последовательность от приблизительно 13 до приблизительно 100 последовательных нуклеотидов, идентичных (или комплементарных) специфической области специфического мутантного аллеля IND.

Специфические зонды, пригодные по изобретению, могут представлять собой следующие:

олигонуклеотиды, имеющие длину в диапазоне от 13н. до приблизительно 1000н., содержащие нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 13 последовательных нуклеотидов, выбранных из 5'- или 3'-фланкирующей последовательности специфического мутантного аллеля IND или комплементарной ей последовательности (т.е., например, последовательности, 5'- или 3'-фланкирующей один или несколько нуклеотидов, делетированных, вставленных или замененных в мутантных аллелях IND по изобретению, такой как последовательность, 5'- или 3'-фланкирующая нонсенс-, миссенс-мутации или мутации сдвига рамки считывания, описанные выше, или последовательность, 5'- или 3'-фланкирующая потенциальные СТОП-кодон-мутации, указанные в таблицах выше, или мутации замены, указанные выше), или последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними (зонды, узнающие 5'-фланкирующие последовательности); или

олигонуклеотиды, имеющие длину в диапазоне от 13н. до приблизительно 1000н., содержащие нуклеотидную последовательность по меньшей мере из 13 последовательных нуклеотидов, выбранных из мутантной последовательности специфического мутантного аллеля IND или комплементарной ей последовательности (т.е., например, последовательности нуклеотидов, вставленных или замененных в генах IND по изобретению, или комплементарные им последовательности), или последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними (зонды, узнающие мутантные последовательности).

Зонды могут полностью состоять из нуклеотидной последовательности, выбранной из упомянутых нуклеотидных последовательностей из фланкирующих и мутантных последовательностей. Однако нуклеотидная последовательность зондов на 5'- или 3'-концах является менее критической. Таким образом, 5'- или 3'-последовательности зондов могут состоять из нуклеотидной последовательности, выбранной из фланкирующей или мутантной последовательности, соответствующим образом, но могут состоять из нуклеотидной последовательности, не родственной фланкирующей или мутантной последовательностям.

Такие неродственные последовательности предпочтительно должны быть не длиннее 50, более предпочтительно, не длиннее 25 или даже не длиннее 20 или 15 нуклеотидов.

Более того, подходящие зонды могут содержать нуклеотидную последовательность или состоять из нуклеотидной последовательности, перекрывающей область соединения фланкирующей и мутантной последовательностей (т.е., например, области соединения последовательности, 5'- или 3'-фланкирующей один или несколько нуклеотидов, делетированных, вставленных или замененных в мутантных аллелях IND по изобретению, и последовательности одного или нескольких нуклеотидов, вставленных или замененных, или последовательности, 3'- или 5'-фланкирующей, соответственно, один или несколько делетированных нуклеотидов, такой как область соединения последовательности, 5'- или 3'-фланкирующей нонсенс-, миссенс-мутации или мутации сдвига рамки считывания в генах IND по изобретению, описанные выше, и последовательности нонсенс-, миссенс-мутаций или мутаций сдвига рамки считывания, или область соединения последовательности, 5'- или 3'-фланкирующей потенциальную СТОП-кодон-мутацию, как указано в таблицах выше, или мутации замены, и последовательности потенциальной СТОП-кодон-мутации или мутации замены, соответственно), при условии, что упомянутая нуклеотидная последовательность не происходит исключительно либо из мутантной, либо из фланкирующей областей.

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

Детекция и/или идентификация "специфической области мутантного IND", гибридизующейся со специфическим зондом, может происходить различными способами, например посредством оценки размера после электрофореза в геле или капиллярного электрофореза или способами детекции на основе флуоресценции. Другие специфические для последовательности способы детекции "специфической области мутантного IND", гибридизующейся со специфическим зондом, также известны в данной области.

Альтернативно, растения или части растений, содержащие один или несколько мутантных аллелей ind, можно получать и идентифицировать с использованием других способов, таких как способ "Delete-a-gene™", в котором используют ПЦР для скрининга делеционных мутантов, полученных быстрым нейтронным мутагенезом (обзор приведен в Li and Zhang, 2002, *Funct Integr Genomics* 2:254-258), с помощью способа TILLING (направленные индуцированные локальные повреждения в геномах), в котором идентифицируют EMS-индуцированные точечные мутации с использованием денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (DHPLC) для детекции изменения пар оснований посредством анализа гетеродуплексов (McCallum et al., 2000, *Nat. Biotech.* 18:455, и McCallum et al. 2000, *Plant Physiol.* 123, 439-442) и т.д. Как упомянуто, в TILLING используют высокопроизводительный скрининг мутаций (например, с использованием расщепления *Cel I* гетеродуплексов ДНК мутантного-дикого типа и детекции с использованием системы секвенирующего геля). Таким образом, в настоящую заявку включено применение TILLING для идентификации растений или частей растения, содержащих один или несколько мутантных аллелей ind, и способы получения и идентификации таких растений, органов растений, тканей и семян. Таким образом, в одном варианте осуществления, способ по изобретению включает в себя стадии мутагенеза семян растения (например EMS-мутагенеза), пулирования отдельных растений или ДНК, амплификации ПЦР интересующей области, формирования гетеродуплексов и высокопроизводительной детекции, идентификации мутантных растений, секвенирования мутантного продукта ПЦР. Понятно, что другие способы мутагенеза и селекции можно равным образом использовать для получения таких мутантных растений.

Вместо индукции мутаций в аллелях IND природные (спонтанные) мутантные аллели можно идентифицировать способами, известными в данной области. Например, можно использовать ECOTILLING (Henikoff et al. 2004, *Plant Physiology* 135(2) :630-6) для скрининга множества растений или частей растения по присутствию природных мутантных аллелей ind. Что касается способов мутагенеза выше, предпочтительно, проводят скрининг видов *Brassica*, содержащих геном А и/или С, так чтобы идентифицированный аллель ind можно было затем вводить в другие виды *Brassica*, такие как *Brassica napus*, посредством скрещивания (меж- или внутривидового скрещивания) и селекции. В ECOTILLING проводят скрининг природных полиморфизмов в генеалогических линиях или родственных видах способом TILLING, описанным выше, в котором индивидуальные растения или пулы растений используют для амплификации ПЦР мишени ind, формирования гетеродуплексов и высокопроизводительного анализа. За этим может следовать селекция индивидуальных растений, обладающих необходимой мутацией, которые затем можно использовать в программе селекции для введения желаемого мутантного аллеля.

Затем идентифицированные мутантные аллели можно секвенировать и последовательность можно сравнивать с аллелем дикого типа для идентификации мутации(мутаций). Необязательно, функциональность можно тестировать, как указано выше. С использованием этого способа можно идентифицировать множество мутантных аллелей ind (и растений *Brassica*, содержащих один или несколько из них). Затем желательные мутантные аллели можно комбинировать с желательными аллелями дикого типа способами скрещивания и селекции, как описано далее ниже. Наконец, получают отдельное растение, содержащее желательное число мутантных аллелей ind и желательное число аллелей IND дикого типа.

Олигонуклеотиды, пригодные в качестве праймеров для ПЦР или специфических зондов для детекции специфического мутантного аллеля IND, также можно использовать для разработки способов опре-

деления статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND.

Для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND можно разработать анализ на основе ПЦР для определения присутствия мутантного специфического аллеля IND и/или соответствующего специфического аллеля IND дикого типа.

Для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND два праймера, специфически узнающие аллель IND дикого типа, можно сконструировать таким образом, чтобы они были направлены друг к другу и обладали областью мутации, локализованной между праймерами. Эти праймеры могут представлять собой праймеры, специфически узнающие 5'- и 3'-фланкирующие последовательности, соответственно. Этот набор праймеров позволяет одновременную диагностическую амплификацию ПЦР мутантного аллеля IND, также как соответствующего аллеля IND дикого типа.

Альтернативно, для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND, два праймера, специфически узнающие аллель IND дикого типа, можно сконструировать таким образом, чтобы они были направлены друг к другу, и чтобы один из них специфически узнавал область мутации. Эти праймеры могут представлять собой праймеры, специфически узнающие последовательность 5'- или 3'-фланкирующей области и мутантной области аллеля IND дикого типа, соответственно. Этот набор праймеров, вместе с третьим праймером, который специфически узнает последовательность области мутации в мутантном аллеле IND, позволяет одновременную диагностическую амплификацию ПЦР мутантного аллеля IND, так же как соответствующего аллеля IND дикого типа.

Альтернативно, для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND, два праймера, специфически узнающие аллель IND дикого типа, можно сконструировать таким образом, чтобы они были направлены друг к другу, и чтобы один из них специфически узнавал область соединения 5'- или 3'-фланкирующей области и области мутации. Эти праймеры могут представлять собой праймеры, специфически узнающие 5'- или 3'-фланкирующую последовательность и область соединения области мутации и 3'- или 5'-фланкирующей области аллеля IND дикого типа, соответственно. Этот набор праймеров вместе с третьим праймером, который специфически узнает область соединения области мутации и 3'- или 5'-фланкирующей области мутантного аллеля IND, соответственно, позволяет одновременную диагностическую амплификацию ПЦР мутантного гена IND, так же как соответствующего гена IND дикого типа.

Альтернативно, статус зиготности специфического мутантного аллеля IND можно определять с использованием альтернативных наборов праймеров, которые специфически узнают аллели IND мутантный и дикого типа.

Если растение является гомозиготным по мутантному гену IND или соответствующему гену IND дикого типа, диагностические анализы ПЦР, описанные выше, приводят к образованию отдельного типичного продукта ПЦР, предпочтительно, типичного по длине, либо для мутантного аллеля IND, либо для аллеля IND дикого типа. Если растение является гетерозиготным по мутантному аллелю IND, появляются два специфических продукта ПЦР, отражающие амплификацию как мутантного аллеля IND, так и аллеля IND дикого типа.

Идентификация продуктов ПЦР, специфических для IND дикого и мутантного типа, может происходить, например, посредством оценки размера после электрофореза в геле или капиллярного электрофореза (например, в случае мутантных аллелей IND, содержащих ряд вставленных или делетированных нуклеотидов, что приводит к разнице размеров между фрагментами, амплифицированными из аллеля IND дикого и мутантного типа, так что указанные фрагменты можно визуально разделить в геле); посредством оценки присутствия или отсутствия двух различных фрагментов после электрофореза в геле или капиллярного электрофореза, при этом диагностическую амплификацию ПЦР мутантного аллеля IND можно, необязательно, проводить отдельно от диагностической амплификации ПЦР аллеля IND дикого типа; посредством прямого секвенирования амплифицированных фрагментов; или посредством способов детекции на основе флуоресценции.

Примеры праймеров, пригодных для определения зиготности специфических мутантных аллелей IND, описаны в примерах.

Альтернативно, для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND можно разработать анализ на основе гибридизации для определения присутствия специфического мутантного аллеля IND и/или соответствующего специфического аллеля IND дикого типа.

Для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND, два специфических зонда, узнающих аллель IND дикого типа, можно сконструировать таким образом, чтобы каждый зонд специфически узнавал последовательность внутри аллеля IND дикого типа, и чтобы область мутации была локализована между последовательностями, узнаваемыми зондами.

Эти зонды могут представлять собой зонды, специфически узнающие 5'- и 3'-фланкирующие последовательности, соответственно. Применение одного или, предпочтительно, обоих из этих зондов позволяет одновременную диагностическую гибридизацию мутантного аллеля IND, так же как соответствующего аллеля IND дикого типа.

Альтернативно, для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND, два специфических зонда, узнающих аллель IND дикого типа, можно сконструировать таким образом, чтобы

каждый зонд специфически узнавал последовательность внутри аллеля IND дикого типа выше или ниже области мутации, предпочтительно выше области мутации, и чтобы один из них специфически узнавал область мутации. Эти зонды могут представлять собой зонды, специфически узнающие последовательность 5'- или 3'-фланкирующей области, предпочтительно 5'-фланкирующей области, и мутантную область аллеля IND дикого типа, соответственно. Применение одного или, предпочтительно, обоих из этих зондов, необязательно, вместе с третьим зондом, который специфически узнает последовательность области мутации мутантного аллеля IND, позволяет диагностическую гибридизацию гена IND мутантного и дикого типа.

Альтернативно, для определения статуса зиготности специфического мутантного аллеля IND, специфический зонд, узнающий аллель IND дикого типа, можно сконструировать таким образом, чтобы зонд специфически узнавал область соединения 5'- или 3'-фланкирующей области, предпочтительно 5'-фланкирующей области, и области мутации аллеля IND дикого типа. Этот зонд, необязательно, вместе со вторым зондом, который специфически узнает область соединения 5'- или 3'-фланкирующей области, предпочтительно 5'-фланкирующей области, и области мутации мутантного аллеля IND, позволяет диагностическую гибридизацию гена IND мутантного и дикого типа.

Альтернативно, статус зиготности специфического мутантного аллеля IND можно определять с использованием альтернативного набора зондов, которые специфически узнают аллели IND мутантного и дикого типа.

Если растение является гомозиготным по мутантному гену IND или соответствующему гену IND дикого типа, диагностические анализы гибридизации, описанные выше, приводят к образованию отдельного специфического типичного продукта гибридизации, такого как один или несколько гибридизующихся фрагментов (рестрикции) ДНК, типичного, предпочтительно, типичного по длине, либо для мутантного аллеля IND, либо для аллеля IND дикого типа. Если растение является гетерозиготным по мутантному аллелю IND, появляются два специфических продукта гибридизации, отражающие гибридизацию как мутантного аллеля IND, так и аллеля IND дикого типа.

Идентификация продуктов гибридизации, специфических для IND дикого и мутантного типа, может происходить, например, посредством оценки размера после электрофореза в геле или капиллярного электрофореза (например, в случае мутантных аллелей IND, содержащих ряд вставленных или делетированных нуклеотидов, что приводит к разнице размеров между гибридизующимися фрагментами (рестрикции) ДНК из аллеля IND дикого и мутантного типа, так что указанные фрагменты можно визуально разделить в геле); посредством оценки присутствия или отсутствия двух различных специфических продуктов гибридизации после электрофореза в геле или капиллярного электрофореза, при этом диагностическую гибридизацию мутантного аллеля IND можно, необязательно, проводить отдельно от диагностической гибридизации аллеля IND дикого типа; посредством прямого секвенирования гибридизующихся фрагментов (рестрикции) ДНК; или посредством способов детекции на основе флуоресценции.

Примеры зондов, пригодных для определения зиготности специфических мутантных аллелей IND, описаны в примерах.

Более того, способы детекции, специфические для специфического мутантного аллеля IND, отличающиеся от способов амплификации на основе ПЦР или гибридизации, можно также разработать с использованием специфической информации о последовательности специфического мутантного аллеля IND, представленной в настоящем документе. Такие альтернативные способы детекции включают в себя способы детекции линейного усиления сигнала на основе инвазивного расщепления конкретных структур нуклеиновой кислоты, известного также как способ Invader™, (как описано, например, в патентах США 5985557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", 6001567 "Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage", содержание которых приведено в настоящем документе в качестве ссылки), способы детекции на основе ОТ-ПЦР, такие как Taqman, или другие способы детекции, такие как SNplex, удлинение одного основания (SBE) и т.п. Кратко, в способе Invader™, последовательность мутации - мишень можно, например, гибридизовать с меченым первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность из мутантной последовательности или последовательности, перекрывающей область соединения 5'-фланкирующей области и области мутации, и со вторым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим 3'-фланкирующую последовательность, непосредственно ниже мутантной последовательности и вплотную к ней, где первый и второй олигонуклеотиды перекрываются по меньшей мере на один нуклеотид. Структура дуплекса или триплекса, которая образуется при этой гибридизации, позволяет избирательное расщепление зонда ферментом (Cleavase®), оставляющим последовательность-мишень intactной. Затем расщепленный меченный зонд детектируют, потенциально посредством промежуточной стадии, приводящей к дополнительному усилению сигнала.

"Набор", как применяют в настоящем документе, относится к набору реагентов для целей осуществления способа по изобретению, более конкретно, идентификации специфического мутантного аллеля IND в биологических образцах или определения статуса зиготности растительного материала, содержащего специфический мутантный аллель IND. Более конкретно, предпочтительный вариант осуществления набора по изобретению содержит по меньшей мере два специфических праймера, как описано 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 любые другие реагенты, описанные в настоящем документе в протоколе ПЦР-идентификации. Альтернативно, согласно другому варианту осуществления этого изобретения, набор может содержать по меньшей мере один специфический зонд, который специфически гибридизуется с нуклеиновой кислотой из биологических образцов для идентификации присутствия 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, в качестве неограничивающих примеров, буфер для гибридизации, метку) для идентификации специфического мутантного аллеля IND в биологических образцах, с использованием специфического зонда.

Набор по изобретению можно использовать и его компоненты можно специфически регулировать, для целей контроля качества (например, чистоты партий семян), детекции присутствия или отсутствия специфического мутантного аллеля IND в растительном материале или материале, содержащем растительный материал или полученном из растительного материала, таком как, в качестве неограничивающих примеров, пищевые или кормовые продукты.

Термин "праймер", как применяют в настоящем документе, относится к любой нуклеиновой кислоте способной направлять синтез возникающей нуклеиновой кислоты в зависимом от матрицы процессе, таком как ПЦР.

Как правило, праймеры представляют собой олигонуклеотиды от 10 до 30 нуклеотидов, но можно применять более длинные последовательности. Праймеры можно предоставлять в двухцепочечной форме, хотя одноцепочечная форма является предпочтительной. Зонды можно использовать в качестве праймеров, но они сконструированы для связывания с ДНК или РНК мишенью, и их необязательно использовать в процессе амплификации.

Термин "узнавание", как применяют в настоящем документе по отношению к специфическим праймерам, относится к тому факту, что специфические праймеры специфически гибридизуются с последовательностью нуклеиновой кислоты специфического мутантного аллеля IND в условиях, указанных в способе (такие как условия из протокола ПЦР-идентификации), при этом специфичность определяют посредством присутствия положительного и отрицательного контролей.

Термин "гибридизация", как применяют в настоящем документе по отношению к специфическим зондам, относится к тому факту, что зонд связывается со специфической областью в последовательности нуклеиновой кислоты специфического мутантного аллеля IND в стандартных условиях строгости. Стандартные условия строгости, как применяют в настоящем документе, относятся к условиям гибридизации, описанным в настоящем документе, или к общепринятым условиям гибридизации, как описано в Sambrook et al., 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY), которые, например, могут включать в себя следующие стадии: 1) иммобилизации фрагментов геномной ДНК растения или ДНК библиотеки ВАС на фильтре, 2) предгибридизации фильтра в течение 1-2 ч при 65°C в 6 × SSC, 5 × реагенте Денхардта, 0,5% SDS и 20 мкг/мл денатурированной ДНК-носителя, 3) добавления зонда для гибридизации, который является меченым, 4) инкубации в течение 16-24 ч, 5) отмывки фильтра один раз в течение 30 мин при 68°C в 6× SSC, 0,1% SDS, 6) отмывки 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 × SSC, 0,1% SDS, и 7) экспонирования фильтра в течение 4-48 ч с рентгеновской пленкой при -70°C.

Как применяют в настоящем документе, "биологический образец" представляет собой образец растения, растительный материал или продукт, содержащий растительный материал. Термин "растение" предназначен, чтобы включать ткани растения, на любой стадии зрелости, также как любые клетки, ткани или органы, взятые или полученные из любого такого растения, включая, без ограничения, любые семена, листья, стебли, цветы, корни, отдельные клетки, гаметы, культуры клеток, культуры тканей или протопласты. "Растительный материал", как применяют в настоящем документе, относится к материалу, полученному или происходящему из растения. Продукты, содержащие растительный материал, относятся к пищевым, кормовым или другим продуктам, которые получены с использованием растительного материала или могут являться загрязненными растительным материалом. Понятно, что в контексте изобретения такие биологические образцы тестируют по присутствию нуклеиновых кислот, специфических для специфического мутантного аллеля IND, подразумевая присутствие нуклеиновых кислот в образцах. Таким образом, способы, на которые ссылаются в настоящем документе для идентификации специфического мутантного аллеля IND в биологических образцах, относятся к идентификации в биологических образцах нуклеиновых кислот, содержащих специфический мутантный аллель IND.

Настоящее изобретение относится также к комбинации специфических аллелей IND в одном растении, к переносу одного или нескольких специфических мутантных аллелей(аллелей) IND от одного растения другому растению, к растению, содержащему один или несколько специфических мутантных аллелей(аллелей) IND, потомству, полученному от этих растений, и к клеткам растения, частям растения и семенам растения, полученным из этих растений.

Один вариант осуществления относится к способу комбинации подходящим образом частично нокаутированных аллелей ind и/или полностью нокаутированных аллелей ind, и/или различных типов частично нокаутированных аллелей ind, и/или полностью нокаутированных аллелей ind в одном растении с высвобождением семян растрескиванием для изменения свойств растрескивания плода растения, в частности, для уменьшения осыпания семян, или замедления осыпания семян до окончания сбора урожая при сохранении в то же время агрономически релевантной обмолачиваемости стручков.

Один аспект относится к способу изменения свойств растрескивания плода, в частности, уменьшения осыпания семян или замедления осыпания семян до окончания сбора урожая, при сохранении в то же время агрономически релевантной обмолачиваемости стручков, растения Brassica, содержащего по меньшей мере два гена IND, включающему в себя стадии

получения и/или селекции растения Brassica, содержащего по меньшей мере два гена IND, где по меньшей мере два аллеля по меньшей мере двух генов IND представляют собой частично нокаутированные аллели ind, как описано выше,

селекции растения с измененными свойствами растрескивания плода, в частности растения, у которого осыпание семян уменьшено или замедлено до окончания сбора урожая, в то время как стручки сохраняют в то же самое время агрономически релевантную обмолачиваемость.

В одном варианте осуществления этого аспекта растение Brassica, содержащее по меньшей мере два гена IND, представляет собой растение Brassica napus, содержащее гены IND-A1 и IND-C1. В конкретном аспекте этого варианта осуществления по меньшей мере два частично нокаутированных аллеля ind представляют собой частично нокаутированные аллели ind гена IND-C1.

В другом аспекте способ дополнительно включает в себя стадию получения и/или селекции растения Brassica, содержащего по меньшей мере два гена IND, где по меньшей мере два дополнительных аллеля по меньшей мере двух генов IND представляют собой полностью нокаутированные аллели ind, как описано выше. В одном варианте осуществления растение Brassica, содержащее по меньшей мере два гена IND, представляет собой растение Brassica napus, содержащее гены IND-A1 и IND-C1. В конкретном аспекте этого варианта осуществления по меньшей мере два частично нокаутированных аллеля ind представляют собой частично нокаутированные аллели ind гена IND-A1, и по меньшей мере два полностью нокаутированных аллеля ind представляют собой полностью нокаутированные аллели ind гена IND-C1.

Другой вариант осуществления изобретения относится к способу получения гибридного сельскохозяйственного растения или семени Brassica, содержащего по меньшей мере два гена IND, в частности гибридного растения или семени Brassica napus, где свойства растрескивания плода растения или растения, выращенного из семени, изменены, в частности, где осыпание семян уменьшено или замедлено до окончания сбора урожая, в то время как стручки сохраняют в то же самое время агрономически релевантную обмолачиваемость, включающему в себя стадии получения и/или идентификации первого растения, содержащего первый частично нокаутированный аллель ind в гомозиготном состоянии, и второго растения, содержащего второй частично нокаутированный аллель ind в гомозиготном состоянии, как описано выше, скрещивания первого и второго растения и сбора F1-гибридных семян после скрещивания, содержащих два частично нокаутированных аллеля ind по меньшей мере двух генов IND.

В следующем варианте осуществления изобретения первое растение, кроме того, содержит первый полностью нокаутированный аллель ind в гомозиготном состоянии, и второе растение, кроме того, содержит второй полностью нокаутированный аллель ind в гомозиготном состоянии, как описано выше, и собирают F1-гибридные семена, содержащие два частично нокаутированных аллеля ind и два полностью нокаутированных аллеля ind по меньшей мере двух генов IND.

Возможность использования родительских растений, содержащих частично и/или полностью нокаутированный аллель ind в гомозиготном состоянии, для получения гибридных семян, из которых можно выращивать растения, обладающие уменьшенным или замедленным осыпанием семян, при сохранении в то же самое время агрономически релевантной обмолачиваемости стручков, обеспечивает преимущества по сравнению с использованием одного родительского растения, содержащего два полностью нокаутированных аллеля ind в гомозиготном состоянии, и одного родительского растения, содержащего один аллель ind в полностью нокаутированном состоянии, как описано в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052), так как оба родительских растения образуют стручки, обладающие агрономически релевантной обмолачиваемостью, в то время как стручки родительского растения, содержащего два полностью нокаутированных аллеля ind в гомозиготном состоянии образуют трубкообразные стручки, из которых трудно собирать семена.

В одном аспекте изобретения первый и второй частично нокаутированные аллели ind являются одинаковыми, так что F1-гибридные семена являются гомозиготными по частично нокаутированному аллелю ind. В другом аспекте изобретения первый и второй полностью нокаутированные аллели ind являются одинаковыми, так что F1-гибридные семена являются гомозиготными по полностью нокаутированному аллелю ind.

Полностью нокаутированные аллели ind (т.е. аллели IND, функциональная экспрессия которых полностью прекращена), такие как описанные в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052), и/или частично нокаутированные аллели ind (т.е. аллели

IND, функциональная экспрессия которых частично прекращена) по изобретению можно комбинировать согласно общепринятым способам селекции.

Частично и/или полностью нокаутированные аллели ind можно, например, комбинировать в одном растении с высвобождением семян растрескиванием посредством:

(а) получения и/или идентификации двух или более растений, каждое из которых содержит один или несколько выбранных частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, как описано выше для частично нокаутированных аллелей ind и в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052) для полностью нокаутированных аллелей ind;

(b) скрещивания первого растения, содержащего один или несколько выбранных частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, со вторым растением, содержащим один или несколько других выбранных частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, сбора F1-семян после скрещивания, и, необязательно, идентификации F1-растения, содержащего один или несколько выбранных частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind из первого растения с одним или несколькими выбранными частично и/или полностью нокаутированными аллелями ind из второго растения, как описано выше;

(с) необязательно, повторения стадии (b) до получения F1-растения, содержащего все выбранные частично и/или полностью нокаутированные аллели ind;

(d) необязательно

идентификации F1-растения, являющегося гомозиготным или гетерозиготным по выбранному частично и/или полностью нокаутированному аллелю ind, посредством определения статуса зиготности мутантных аллелей IND, как описано выше для частично нокаутированных аллелей ind и в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052) для полностью нокаутированных аллелей ind; или

получения растений, являющихся гомозиготными по одному или нескольким из выбранных частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind посредством осуществления одной из следующих стадий:

выделения двойных гаплоидных растений из обработанных клеток микроспор или пыльцы F1-растений, содержащих один или несколько выбранных частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, как описано выше;

самовоспроизводства F1-растений, содержащих один или несколько выбранных частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, в течение одного или нескольких поколений (y), сбора F1 Sy-семян после самовоспроизводства и идентификации F1 Sy-растений, являющихся гомозиготными по одному или нескольким частично и/или полностью нокаутированным аллелям ind, как описано выше.

Частично и/или полностью нокаутированные аллели ind можно, например, переносить от одного растения с высвобождением семян растрескиванием другому посредством:

(а) получения и/или идентификации первого растения, содержащего один или несколько выбранных частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, как описано выше, или получения первого растения посредством комбинации одного или нескольких частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind в одном растении, как описано выше (где первое растение является гомозиготным или гетерозиготным по одному или нескольким частично и/или полностью нокаутированным аллелям ind);

(b) скрещивания первого растения, содержащего один или несколько частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, со вторым растением, не содержащим одного или нескольких частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, сбора F1-семян после скрещивания (где семена являются гетерозиготными по частично и/или полностью нокаутированному аллелю ind, если первое растение являлось гомозиготным по этому частично и/или полностью нокаутированному аллелю ind, и где половина семян являются гетерозиготными и половина семян являются азиготными по частично и/или полностью нокаутированному аллелю ind, т.е. не содержат его, если первое растение являлось гетерозиготным по этому частично и/или полностью нокаутированному аллелю ind), и, необязательно, идентификации F1-растений, содержащих один или несколько выбранных частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, как описано выше;

(с) обратного скрещивания F1-растений, содержащих один или несколько выбранных частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, со вторым растением, не содержащим одного или нескольких частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, в течение одного или нескольких поколений (x), сбора BCx-семян после скрещивания, и идентификации в каждом поколении BCx-растений, содержащих один или несколько выбранных частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, как описано выше;

(d) необязательно, получения BCx-растений, являющихся гомозиготными по одному или нескольким выбранным частично и/или полностью нокаутированным аллелям ind посредством проведения одной из следующих стадий:

выделения двойных гаплоидных растений из обработанных клеток микроспор или пыльцы BCx-растений, содержащих один или несколько желательных частично и/или полностью нокаутированных аллелей ind, как описано выше, самовоспроизводства BCx-растений, содержащих один или не-

сколько желательных частично и/или полностью нокаутированных аллелей(аллель) ind в течение одного или нескольких поколений (y), сбора BCx Sy-семян после самовоспроизводства и идентификации BCx Sy-растений, являющихся гомозиготными по одному или нескольким желательным частично и/или полностью нокаутированным аллелям ind, как описано выше.

Первое и второе растение с высвобождением семян растрескиванием могут представлять собой растения Brassicaceae, в частности растения Brassica, особенно растения Brassica napus или растения из других сельскохозяйственных видов Brassica. Альтернативно, первое растение может представлять собой растение Brassicaceae, в частности растение Brassica, особенно растение Brassica napus или растение из других сельскохозяйственных видов Brassica, и второе растение может представлять собой растение из генеалогической линии Brassicaceae, в частности, из генеалогической линии Brassica, особенно из генеалогической линии Brassica napus или из генеалогической линии из других сельскохозяйственных видов Brassica. "Генеалогическая линия", как применяют в настоящем документе, представляет собой линию предпочтительно гомозиготных растений, которую можно отличать от других линий растений по предпочтительному генотипу и/или фенотипу, которую используют для получения гибридного потомства.

#### Последовательности

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

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

SEQ ID NO: 3: Кодированная ДНК гена *IND-C1*, кодирующего белок *IND-C1* дикого типа из *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 дикого типа *IND-A1* из *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 из *Brassica napus*.

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

NO: 7.

SEQ ID NO: 9: Кодирующая ДНК гена *IND1 Arabidopsis*.

SEQ ID NO: 10: Белок *IND1 Arabidopsis*, кодируемый SEQ ID

NO: 9.

SEQ ID NO: 11: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS06 и

-WT

SEQ ID NO: 12: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS06

SEQ ID NO: 13: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-WT

SEQ ID NO: 14: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS09 и

-WT

SEQ ID NO: 15: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS09

SEQ ID NO: 16: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-WT

SEQ ID NO: 17: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS13 и

-WT

SEQ ID NO: 18: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-EMS13

SEQ ID NO: 19: Олигонуклеотид для детекции IND-A1-WT

SEQ ID NO: 20: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS04 и

-WT

SEQ ID NO: 21: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS04

SEQ ID NO: 22: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-WT

SEQ ID NO: 23: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS08 и

-WT

SEQ ID NO: 24: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS08

SEQ ID NO: 25: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-WT

SEQ ID NO: 26: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS09 и

-WT

SEQ ID NO: 27: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-EMS09

SEQ ID NO: 28: Олигонуклеотид для детекции IND-C1-WT

Если в примерах не указано иначе, все способы рекомбинантной ДНК осуществляют согласно общепринятым способам молекулярной биологии, как описано в Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, в томах 1 и 2 Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA и в томах I и II Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, Second Edition, Academic Press (UK). Общепринятые материалы и методы для молекулярных манипуляций с растениями описаны в *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) by R.D.D. Crox, совместно опубликованной BIOS Scientific Publications Ltd (UK) и Blackwell Scientific Publications, UK. Общепринятые материалы и методы для полимеразных цепных реакций можно обнаружить в Diefenbach and Dveksler (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, и в McPherson et al. (2000) *PCR - Basics: From Background to Bench*, First Edition, Springer Verlag, Germany. Общепринятые способы анализа AFLP описаны в Vos et al. (1995, NAR 23:4407-4414) и в опубликованной ЕР патентной заявке EP 534858.

### Примеры

Пример 1. Получение и выделение частично нокаутированных мутантных аллелей IND (ind).

Мутации в генах IND, показанные в SEQ ID NO: 1 или 3 и 5 или 7 в списке последовательностей, получали и идентифицировали следующим образом:

30000 семян из генеалогической линии элитного ярового масличного рапса (семена M0) подвергали предварительному набуханию в течение двух часов на влажной фильтровальной бумаге в деионизированной или дистиллированной воде. Половину семян подвергали воздействию 0,8% EMS, а половину - 1% EMS (Sigma: M0880) и инкубировали в течение в течение 4 ч;

подвергнутые мутагенезу семена (семена M1) промывали 3 раза и высушивали в вытяжном шкафу в течение ночи. 30000 растений M1 выращивали в почве и подвергали самовоспроизводству для получения семян M2. Семена M2 собирали для каждого индивидуального растения M1;

два раза выращивали по 4800 растений M2, полученных из растений M1, и получали образцы ДНК из образцов листьев каждого индивидуального растения M2 согласно способу CTAB (Doyle and Doyle, 1987, *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15);

проводили скрининг образцов ДНК по присутствию точечных мутаций в генах IND, вызывающих замену аминокислот в белках IND, в частности в домене bHLH белков IND, и посредством прямого секвенирования стандартными способами секвенирования (Agowa) и анализа последовательностей по при-

существованию точечных мутаций с использованием программного обеспечения NovoSNP (VIB Antwerp);

таким образом идентифицировали частично нокаутированные мутантные аллели IND (ind), указанные в табл. 3а и b выше.

В заключение, в вышеуказанных примерах показано, как можно получать и выделять частично нокаутированные мутантные аллели IND. Растительный материал, содержащий такие мутантные аллели, можно также использовать для комбинации выбранных мутантных аллелей IND в растении, как описано в следующих примерах.

Пример 2. Идентификация растения Brassica, содержащего частично нокаутированный мутантный аллель IND Brassica.

Растения Brassica, содержащие мутации в генах IND, идентифицированные в примере 1, идентифицировали следующим образом.

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

Проводили скрининг образцов ДНК по присутствию идентифицированных точечных мутаций IND, как описано выше в примере 1.

Гетерозиготные и гомозиготные (как определяли на основании электрофореграмм) растения M2, содержащие одну и ту же мутацию, подвергали самовоспроизводству и собирали семена M3.

Пример 3. Анализ свойств растрескивания плода растений Brassica, содержащих частично и/или полностью нокаутированный мутантный ген IND Brassica.

Для определения корреляции между присутствием частично и/или полностью нокаутированных мутантных генов IND в растениях Brassica и свойствами растрескивания плода растений Brassica, свойства растрескивания плода растений Brassica napus, содержащих один частично нокаутированный мутантный ген IND в гомозиготном состоянии или оба частично и полностью нокаутированных мутантных гена IND в гомозиготном состоянии, анализировали в теплице и в полевых условиях и сравнивали со свойствами растрескивания плода растений Brassica napus, содержащих 2-4 полностью нокаутированных аллеля ind, как описано в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052), следующим образом.

Для определения, влияет ли и как влияет на границу створок плода и свойства раскрытия стручков с семенами присутствие частично и/или полностью нокаутированных мутантных генов IND, плод ind сравнивали с плодом дикого типа с использованием следующих макроскопических тестов:

(а) обследование стручков с семенами и растений, как правило, невооруженным глазом для определения различий в фенотипе стручков и растений, вызванных присутствием различных частично и/или полностью нокаутированных мутантных генов IND. Определение фенотипа стручков: когда стручки являлись полностью выросшими и наполненными, непосредственно перед пожелтением, степень четкости зоны, разграничивающей створку и носик в зоне, где обе створки больше не соприкасаются (на дистальном конце стручка), 5 случайно выбранных стручков (от различных растений, если доступно несколько растений на линию) оценивали и присваивали баллы от 0 до 10 или от 1 до 5: 0 или 1, соответственно, в случае явной впадины и тонкой отчетливой зоны, разделяющей створку и носик; 1-3 или 2, соответственно, в случае некоторой впадины и явной, хотя более расплывчатой, зоны, отделяющей створку от носика; 4-6 или 3, соответственно, в случае створок и носика, которые еще можно хорошо наблюдать в виде двух отдельных тканей, но с очень плавным переходом между ними; 7-9 или 4, соответственно, в случае створок и носика, которые едва можно наблюдать в виде отдельных тканей; 10 или 5, соответственно, в случае полностью размытого перехода между створками и носиком без какой-либо явной разницы между обоими типами тканей, т.е. чем меньше впадина между створкой и носиком на дистальном конце стручков, тем выше балл. Балл 0 или 1, соответственно, (отчетливая впадина между створками и носиком) соответствует фенотипу стручков дикого типа, более конкретно, чувствительному к растрескиванию стручков фенотипу стручков; балл 1-9 или 2-4, соответственно, (более постепенный переход между створкой и носиком) соответствует устойчивому к растрескиванию стручков фенотипу стручков, при котором осыпание семян является значительно уменьшенным или замедленным при сохранении в то же время агрономически релевантной обмолачиваемости стручков, так что стручки еще можно открыть по зоне растрескивания при приложении ограниченных физических сил; и балл 10 или 5, соответственно, (отсутствие впадины между створкой и носиком) соответствует устойчивому к растрескиванию стручков фенотипу стручков, при котором осыпание семян является уменьшенным или замедленным до такой степени, которая больше не допускает агрономически релевантной обмолачиваемости стручков, так что стручки нельзя открыть по зоне растрескивания при приложении ограниченных физических сил;

(б) ручное испытание на ударную нагрузку (MIT) для определения увеличения устойчивости к растрескиванию стручков, вызванного присутствием различных частично и/или полностью нокаутированных мутантных генов IND: уровень устойчивости к растрескиванию стручков линий Brassica napus, содержащих один частично нокаутированный мутантный ген IND в гомозиготном состоянии или оба частично и полностью нокаутированных мутантных гена IND в гомозиготном состоянии и линий Brassica,

содержащих соответствующие аллели IND дикого типа, сравнивали полуколичественным способом посредством определения физических сил, необходимых для раскрытия закрытых зрелых стручков посредством приложения скручивания к стручкам вручную. Устойчивости к растрескиванию стручков для стручков присваивали балл от 1 до 5 на основании этой физической силы: 1 в случае стручков, которые полностью раскрываются по зоне растрескивания при самом слабом скручивании, 2-4 в случае стручков, которые раскрываются только в основании зоны растрескивания и для полного раскрытия которых необходимо более сильное скручивание, и 5 в случае стручков, которые можно только разрушить, а не открыть по зоне растрескивания;

(с) тест испытания на случайную ударную нагрузку (RIT) для определения увеличения устойчивости к растрескиванию стручков вызванного присутствием различных частично и/или полностью нокаутированных мутантных генов IND: уровень устойчивости к растрескиванию стручков линий *Brassica napus*, содержащих один частично нокаутированный мутантный ген IND в гомозиготном состоянии или оба частично и полностью нокаутированных мутантных гена IND в гомозиготном состоянии и линий *Brassica*, содержащих соответствующие аллели IND дикого типа, сравнивали полуколичественным способом посредством определения времени полужизни образцов стручков из обеих линий согласно Bruce et al. (2002, выше). Более конкретно, два повторных образца из 20 интактных зрелых стручков из каждой линии подвергали RIT. 20 стручков помещали вместе с шестью стальными шарами диаметром 12,5 мм в цилиндрический контейнер диаметром 20 см с расположенной вертикально осью. Затем контейнер подвергали простому гармоническому движению с частотой 4,98 Гц удара на 51 мм в горизонтальной плоскости. Стручки, проверенные на прочность перед тестом, встряхивали в течение суммарных периодов времени 10, 20, 40 и, если более 50% стручков оставались интактными, 80 с. Барабан открывали после каждого периода и подсчитывали число закрытых стручков. Стручки обследовали и классифицировали как "закрытые", если зона растрескивания обеих створок все еще являлась закрытой. Таким образом, стручки классифицировали как "открытые", если одна или обе створки оставались нетронутыми, так, чтобы семена высвобождались. Если большинство стручков являлись сломанными или разрушенными без раскрытия зоны растрескивания, образец пометали "не пригодным для подсчета" (отмечен \* в табл. 5b). Для получения равновзвешенного в каждой точке данные приводили к расположению с равными интервалами по независимой переменной, времени, посредством прибавления 1 и взятия  $\log_{10}$ . Процент открытых стручков  $p$  преобразовывали посредством логит-преобразования, т.е. логит

$$p = \log_e(p/100-p).$$

Затем преобразованные данные времени и процентов подставляли в линейную модель и использовали для определения времени полужизни;

(d) тесты в полевых условиях для определения связи между устойчивостью к растрескиванию стручков, обмолачиваемостью и урожайностью и присутствием конкретных мутантных аллелей IND в растениях: уровень устойчивости к растрескиванию стручков, обмолачиваемость и урожайность линий *Brassica*, содержащих мутантные аллели IND, и линий *Brassica*, содержащих соответствующие аллели IND дикого типа, сравнивали полуколичественным способом посредством определения и сравнения уровня осыпания семян (SHAT), возможности уборки комбайном (CHA1) и обмолачиваемости (CHA2) и количественным способом посредством определения и сравнения урожая семян на участок после уборки комбайном (YLDP) и урожая семян после обмолачивания соломы (YLDS) в полевых условиях между участками с растениями ind и участками с растениями дикого типа. Участкам присваивали баллы 1-9 для указания уровня осыпания семян на участке до сбора урожая: от балла 1 для указания на то, что практически все растения на участке осыпались до сбора урожая, до балла 9 для указания на то, что растения на участке практически не осыпались. Участкам присваивали баллы 1-5 для указания уровня возможности уборки комбайном на участке: баллы от 1, до 3 или до 5 для указания на то, что является сложным, до осуществимого, или до простого, соответственно, убирать участок с помощью комбайна. Участкам присваивали баллы 1-5 для указания уровня обмолачиваемости участка: баллы от 1 до 3 или до 5 для указания на то, что является сложным, до осуществимого, или до простого, соответственно, вручную собрать семена, оставшиеся в соломе после уборки комбайном. Урожай семян на участке после уборки комбайном (YLDP; выраженный в граммах на участок) определяли посредством уборки семян на участке с помощью уборочного комбайна и взвешивания семян, и урожай семян после обмолачивания соломы (YLDS; выраженный в мас.% соломы) определяли посредством ручного сбора семян, оставшихся в соломе после уборки семян с помощью уборочного комбайна.

Для более точного анализа, влияет ли и как влияет на клетки на границах створок стручков с семенами присутствие частично и/или полностью нокаутированных мутантных генов IND, срезы плодов ind сравнивали со срезами плодов дикого типа посредством микроскопической оценки стручков с семенами.

Эксплантаты: эксплантаты приблизительно по 3 мм, взятые из центра и дистальных концов стручков на сходной стадии развития (приблизительно 35 суток после цветения (DAA), стадии развития, близко соответствующей началу видимого пожелтения околоплодника) и сходного размера, отбирали из растений, выращенных в теплице (по три стручка для каждого генотипа). По одной зоне растрескивания вырезали из стручков.

Фиксация: фиксацию выполняли в 100 мМ К-фосфатном буфере, pH7 с помощью 10% формалина и



0,25% глутаральдегида в течение всего 4 ч. Вакуумную инфильтрацию выполняли через 1 и 2 ч в течение 15 мин. Фиксация обновляли после каждой вакуумной инфильтрации.

Дегидратация: образец промывали 2 раза по 30 мин 100 мМ К-фосфатным буфером pH7. Дегидратацию выполняли техническим этанолом, разведенным 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.

Погружение: погружение выполняли с помощью наборов для погружения Leica 7022-31731 Historesin или Kulzer Histo-Technik 7100 (Heraeus), которые представляют собой трехкомпонентные наборы смолы (основной смолы, активатора и отвердителя). Три компонента использовали в соотношениях согласно рекомендациям производителя, следующим образом: образец инкубировали в течение 4 ч в 50% этаноле/50% основной смоле, в течение ночи в 30% этаноле/70% основной смоле (необязательно: при 4°C), в течение 2-4 ч в 100% основной смоле, в течение одних суток в 100% основной смоле после обновления основной смолы и проводили вакуумную инфильтрацию в течение 20' (необязательно, при 4°C), в течение одних суток в основной смоле + активатор (1%) ("среда для инфильтрации") после вакуумной инфильтрации в этой среде в течение 20 мин. Образец промывали основной смолой + активатор (1%) + отвердитель (1 мл в 15 мл) ("среда для погружения"). Погружение выполняли в плоских модулях для погружения (плоские модули для погружения AGAR с полостями приблизительно 300 мкл: длина 14 мм × ширина 6 мм × глубина 4 мм): добавляли 100-125 мкл среды для погружения/полость, среда для погружения полимеризовалась при 55°C в течение приблизительно одного часа, ткань помещали в полимеризованную среду для погружения (1 эксплантат/полость), полости заполняли средой для погружения, среда для погружения полимеризовалась в течение 3-5 ч при 55°C, модули охлаждали, пластиковые блоки вынимали из модулей и сохраняли при комнатной температуре в закрытом контейнере (например, пробирке эппендорф).

Получение срезов: пластиковые блоки приклеивали плоской стороной на блок из перперкса 1 см<sup>3</sup> и обрезами по квадрату вокруг образца. Срезы по 4 мкм (3-4 эксплантата на генотип, приблизительно 25 срезов на эксплантат) нарезали стеклянным ножом Ральфа (установленного в положение -1 устройства для гистологического ножа Reichert-Jung с использованием стеклянных палочек толщиной 6 мм под углом нарезания приблизительно 6°) в микротоме. Срезы прикрепляли к предметным стеклам, обработанным Vectabond (Vector laboratories).

Демонстрация лигнина: неокрашенные срезы погруженные в Eukitt, обследовали с использованием микроскопа, оборудованного для флуоресценции (с набором фильтров Zeiss 02). Лигнин флуоресцирует светло-голубым.

Оценка гистологии: неокрашенные срезы визуализировали с использованием DIC-Normaski или автофлуоресценции (с набором фильтров Zeiss 18 - возбуждение BP390-420; излучение LP450).

Растительный материал.

Потомство линии растений, содержащей полностью нокаутированную мутацию в гене IND-A1 (обозначенную как ind-a1<sup>F</sup>), в частности аллель ind-a1-EMS01, описанный в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052) (обозначенный как ind-a1-01 в табл. 5), и частично нокаутированную мутацию в гене IND-C1 (обозначенную как ind-c1<sup>P</sup>), в частности аллели ind-c1-EMS04, -EMS08 и -EMS09, указанные в табл. 3b (обозначенные как ind-c1-04, -08, и -09 в табл. 5), с генотипом ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>, ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup> (т.е. растения с двойной гомозиготной мутацией), IND-A1/IND-A1, ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup> (т.е. растения, гомозиготные по одиночной мутации), и IND-A1/IND-A1, IND-C1/IND-C1 (т.е. растения дикого типа).

Потомство линии растений, содержащей частично нокаутированную мутацию в гене IND-A1 (обозначенную как ind-a1<sup>P</sup>), в частности аллели ind-a1-EKS06, -EMS09 и -EMS13, указанные в табл. 3a (обозначенные как ind-a1-06, -09 и -13 в табл. 5), и полностью нокаутированную мутацию в гене IND-C1 (обозначенную как ind-c1<sup>F</sup>), в частности ind-c1-EKS01 аллель и аллель ind-c1-EMS03, описанные в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052) (обозначенные как ind-c1-01 и -03 в табл. 5), с генотипом ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>, ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup> (т.е. растения с двойной гомозиготной мутацией), IND-A1/IND-A1, ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup> (т.е. растения, гомозиготные по одиночной мутации), и IND-A1/IND-A1, IND-C1/IND-C1 (т.е. растения дикого типа).

Макроскопическая оценка:

а) обследование стручков с семенами и растений невооруженным глазом.

Стручки от гомозиготных растений-сисбсов с двойной мутацией IND с генотипом ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>, ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup> или ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>, ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup> обладали фенотипом, сходным со стручками от растений, содержащих один полностью нокаутированный аллель ind в гомозиготном состоянии и один полностью нокаутированный аллель ind в гетерозиготном состоянии, описанных в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052) (генотип: ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>, IND-C1/ind-c1<sup>F</sup> или IND-A1/ind-a1<sup>F</sup>, ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>, где ind-a1<sup>F</sup> представляет собой полностью нокаутированный аллель ind-a1, в частности аллель ind-a1-EMS01 или ind-a1-EMS05, описанный в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052), и где ind-c1<sup>F</sup> представляет собой полностью нокаутированный аллель ind-c1, в частности, аллель ind-c1-EMS01 или ind-c1-

EMS03, описанный в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052)). Более конкретно, границы створок стручков этих растений-сисбсов с мутантным IND являлись, как правило, лучше определенными, чем в растениях-сисбсах, гомозиготных по двойному полностью нокаутированному мутантному IND, описанных в WO 09/068313 (по которой испрашивается приоритет Европейской патентной заявки EP 07023052) (для которых показано отсутствие точного определения границ створки, в частности различимых как на проксимальном, так и на дистальном конце плода, по сравнению с стручками от растений-сисбсов с IND дикого типа), но четкая впадина между створкой и носиком на дистальном конце стручков в растениях-сисбсах дикого типа еще в значительной мере отсутствовала в этих мутантных растениях, как в растениях-сисбсах, гомозиготных по двойному полностью нокаутированному ind, которые обладают также более плавным переходом между тканями створки и носика (см. также баллы визуальной оценки в табл. 5а для выращенных в теплице растений и в табл. 5b для выращенных в полевых условиях растений).

Стручки от растений-сисбсов, гомозиготных по одиночной мутации IND (генотип: IND-A1/IND-A1, ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup> или ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>, IND-C1/IND-C1), обладают морфологией стручка, сходной со стручками от растений-сисбсов с IND дикого типа, за исключением стручков от растений-сисбсов, гомозиготных по одиночной мутации IND, с генотипом IND-A1-EMS01/IND-A1-EMS01, ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09, которые обладают измененной морфологией стручков, сходной со стручками от растений-сисбсов, гомозиготных по двойной мутации IND с генотипом ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>, ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup> или ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>, ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup> (см. также баллы визуальной оценки в табл. 5а для выращенных в теплице растений и в табл. 5b для выращенных в полевых условиях растений). Кроме того, наблюдали, что присутствие аллеля ind-c1-EMS09 в гетерозиготном состоянии в растениях (генотип: IND-A1/IND-A1, IND-C1/ind-c1-EMS09) являлось достаточным, чтобы вызвать измененную морфологию стручка, сходную со стручками от растений-сисбсов, гомозиготных по двойной мутации IND, с генотипом ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>, ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup> или ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>, ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>. Считают, что аллель ind-c1-EMS09, содержащий мутацию замены консервативной аминокислоты основного ДНК-связывающего домена, может приводить к доминантно негативному белку IND, еще способному к формированию димеров, но не способному к связыванию с участком связывания bHLH регулируемого гена(генов).

б) Тест испытания на случайную ударную нагрузку. В табл. 5 показано, что величина LD50, как правило, является более высокой для стручков от растений, содержащих полностью нокаутированный аллель ind-c1 в гомозиготном состоянии и частично нокаутированный аллель ind-a1 в гомозиготном состоянии, чем для стручков от растений, содержащих полностью нокаутированный аллель ind-a1 в гомозиготном состоянии и частично нокаутированный аллель ind-c1 в гомозиготном состоянии, указывая на то, что мутации в аллеле IND-C1 могут оказывать более сильный эффект на устойчивость к растрескиванию стручков, чем мутации в аллеле IND-A1.

Таблица 5а

Генотип	Баллы визуальной оценки (0-10)	LD50 (сек)	Корректированное нижнее 95%	Корректированное верхнее 95%
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	8,06	3,1	1,78
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	9,05	2,83	2,15
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	7	26,31	4,83	7,64
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8,86	*	*
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	5,74	4,2	2,06
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	7	29,38	3,8	5,18
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	9,36	2,6	1,7
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	9,05	2,83	2,15
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	8	52,03	8,96	14,03
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8,44	2,74	2,26
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	9,05	2,83	2,15
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8,5	85,57	23,34	64,64

<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	3	12,91	2,4	2,46
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	2	14,2	2,2	2,59
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	7	61,21	9,6	15,18
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8,86	*	*
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	7,74	3,98	1,54
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	9	56,68	8,9	13,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-04/IND-C1-04</i>	0	7,89	2,88	2
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	0	10,91	2,5	2
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	9	37,8	5,77	8,4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-08/IND-C1-08</i>	0	8,94	2,78	2,38
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	0	9,8	2,8	2,1
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8,5	31,81	6,66	10,45
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-09/IND-C1-09</i>	0	7,22	3,56	1,82
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	8,5	46,6	7,82	11,48
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	9	90,11	*	*

Таблица 5b

Генотип	Баллы визуальной оценки (1-5)	Баллы на основании физической силы, необходимой для раскрытия закрытых зрелых стручков (1-5)	LD50 (сек)	
			поле 1	поле 2
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	9,7	7,2
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	6,2	8,3
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	2	2	17,0	16,6
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	6,5	6,6
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	7,4	5,3
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	3	2	15,3	12,4
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	7,5	6,9
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	5,4	7,2
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	3	4	60,1	77,0
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	6,6	6,2

<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	7,7	7,0
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	3	4	49,8	63,0
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	11,7	10,7
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	10,7	7,9
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	3	3	19,1	22,9
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	5,4	5,7
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	9,2	8,3
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	3	3	10,2	38,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-04/IND-C1-04</i>	1	1	6,5	7,4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	1	2	9,5	7,2
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	3	5	87,7	126,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-08/IND-C1-08</i>	1	1	9,7	8,3
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	1	1	4,9	9,0
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	3	3	14,9	23,7
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-09/IND-C1-09</i>	1	1	9,1	8,3
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	3	2	7,9	8,3
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	5	5	*	*

с) Тесты в полевых условиях.

В табл. 5с показан уровень осыпания семян (SHAT), возможность уборки комбайном (CHA1), обмолачиваемость (CHA2), урожай семян на участок после уборки комбайном (YLDP) и урожай семян после обмолачивания соломы (YLDS), определенные, как описано выше, для участков поля с растениями ind и растениями дикого типа, как указано. Значение Урожайность WT Seg% представляет YLDP в виде процента от сегреганта дикого типа в пределах одной сегрегирующей популяции.

Таблица 5с

Генотип	SHAT (1-9)	CHA1 (1-5)	CHA2 (1-5)	YLDP (в граммах на участок)	Урожай- ность WT Seg%	YLDS (в % масс. соломы)
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,3	5,0	5,0	2263,3	100	0,4

<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,4	4,6	5,0	2274,9	101	0,3
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	8,7	4,4	4,9	2525,1	112	1,1
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,6	4,6	4,9	2102,0	100	0,5
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,7	4,8	5,0	2292,7	109	0,4
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8,8	4,1	4,6	2276,2	108	1,3
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,3	5,0	4,9	1964,2	100	0,3
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,0	4,7	5,0	1872,0	95	0,4
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	9,0	2,7	3,8	2323,3	118	5,7
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,6	4,8	5,0	2168,9	100	0,5
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,3	4,7	5,0	1985,6	92	0,4
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	9,0	1,9	3,6	1726,7	80	13,6
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,3	4,8	5,0	1977,1	100	0,4
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8,4	4,2	4,9	1929,3	98	0,5
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	8,9	3,6	4,7	2445,6	124	2,0
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,3	4,2	5,0	1885,1	100	0,4
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8,3	4,8	5,0	2137,8	113	0,6
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8,9	2,8	3,9	2120,9	113	4,8
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-04/IND-C1-04</i>	8,8	4,9	4,8	2120,4	100	0,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	8,6	4,8	5,0	2136,4	101	0,6
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	9,0	1,8	2,8	1437,0	68	19,1
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-08/IND-C1-08</i>	8,0	4,8	5,0	2250,4	100	0,6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8,3	4,3	4,9	2131,3	95	0,5
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8,9	3,0	4,1	2385,1	106	2,5
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-09/IND-C1-09</i>	8,7	4,9	5,0	2080,0	100	0,4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	8,7	4,6	4,6	2447,8	118	1,0
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	9,0	1,1	1,8	589,6	28	28,4

Микроскопическая оценка.

Стручки от растений-сисбсов, гомозиготных по двойной мутации IND, с генотипом *ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>, ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>* или *ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>, ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>*, и стручки от растений-сисбсов, гомозиготных по одиночной мутации IND с генотипом *IND-A1-EMS01/IND-A1-EMS01, ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09*, выращенных в условиях теплицы, обладали лигнификацией на дистальных концах на всем протяжении зоны растрескивания и слабой дифференцировкой клеток, принадлежащих к зоне растрескивания, от соседних типов клеток, таких как клетки тканей сосудов и лигнифицированный слой клеток, в норме обнаруженный на внутренней стенке стручка (т.е. клетки эндокарпия б). В центре стручков лигнификация не происходила на всем протяжении зоны растрескивания, но вместо этого стручки обладали только несколькими дополнительными слоями лигнифицированных клеток, где внутренняя стенка стручка присоединена к перегородке.

Стручки от растений-сисбсов, гомозиготных по двойной мутации IND, с генотипом *ind-a1-EMS01/ind-a1-EMS01, ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09*, обладали как на дистальных концах, так и в центре стручков лигнификацией на всем протяжении зоны растрескивания и слабой дифференцировкой клеток, принадлежащих к зоне растрескивания, от соседних типов клеток, таких как клетки тканей сосудов и лигнифицированный слой клеток, в норме обнаруженный на внутренней стенке стручка (т.е. клетки эндокарпия б).

Пример 4. Детекция мутантных генов IND в (элитных) линиях Brassica и/или перенос мутантных

генов IND в (элитные) линии Brassica.

Мутантные гены IND переносят в (элитные) генеалогические линии Brassica следующим способом: растение, содержащее мутантный ген IND (донорное растение), скрещивают с (элитной) линией Brassica (элитный родитель/рекуррентный родитель) или с сортом без мутантного гена IND. Используют следующую схему интрогрессии (мутантный ген IND обозначают как ind, в то время как дикий тип обозначают как IND).

Начальное скрещивание: ind/ind (донорное растение) × IND/IND (элитный родитель);

F1-растение: IND/ind.

BC1 скрещивание: IND/ind × IND/IND (рекуррентный родитель);

BC1-растения: 50% IND/ind и 50% IND/IND;

50% IND/ind отбирают с использованием молекулярных маркеров (например, AFLP, ПЦР, Invader™ и т.п.; см. также ниже) для мутантного аллеля IND (ind).

BC2 скрещивание: IND/ind (BC1 растение) × IND/IND (рекуррентный родитель);

BC2-растения: 50% IND/ind и 50% IND/IND;

50% IND/ind отбирают с использованием молекулярных маркеров для мутантного аллеля IND (ind).

Обратное скрещивание повторяют от BC3 до BC6;

BC3-6-растения: 50% IND/ind и 50% IND/IND;

50% IND/ind отбирают с использованием молекулярных маркеров для мутантного аллеля IND (ind).

Для уменьшения числа обратных скрещиваний (например, до BC3 вместо BC6), можно использовать молекулярные маркеры, специфические для генетического фона элитного родителя.

BC3-6 S1 скрещивание: IND/ind × IND/ind;

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

Растения, содержащие ind, отбирают с использованием молекулярных маркеров для мутантного аллеля IND (ind). Индивидуальные растения BC3-6 S1, являющиеся гомозиготными по мутантному аллелю IND (ind/ind), отбирают с использованием молекулярных маркеров для аллелей IND мутантного и дикого типа. Эти растения затем используют для получения семян.

Для отбора растений, содержащих точечную мутацию в аллеле IND, можно использовать прямое секвенирование посредством общепринятых способов секвенирования, известных в данной области, такие как способы, описанные в примере 1.

Альтернативно, можно разработать анализы ПЦР, чтобы отличать растения, содержащие специфическую точечную мутацию в аллеле IND, от растений, не содержащих эту специфическую точечную мутацию. Следующие дискриминирующие анализы ПЦР можно разработать таким образом, чтобы детектировать присутствие или отсутствие и статус зиготности мутантных аллелей, идентифицированных в примере 1 (см. табл. 3а и 3b):

ДНК-матрица:

геномная ДНК, выделенная из материала листа гомозиготных или гетерозиготных мутантных растений Brassica (содержащих мутантный/аллель IND, далее в настоящем документе называемый "IND-Xx-EMSXX");

контрольная ДНК дикого типа: геномная ДНК, выделенная из материала листа растений Brassica дикого типа (содержащих эквивалент дикого типа для мутантного аллеля IND, далее в настоящем документе называемый "IND-Xx-WT");

положительный контроль ДНК: геномная ДНК, выделенная из материала листа гомозиготных мутантных растений Brassica, как известно, содержащих IND-Xx-EMSXX;

как правило, каждый набор праймеров состоит из одного праймера, специфического для гена-мишени, как мутантного, так и дикого типа (например, праймера, специфического для обоих аллелей IND-A1-EMS06 и IND-A1-WT), и одного праймера, специфического для отличающегося нуклеотида (например, праймера, специфического либо для аллеля IND-A1-EMS06, либо для аллеля IND-A1-WT). Как правило, последний нуклеотид последнего праймера совпадает с отличающимся нуклеотидом, но один (или несколько) дополнительных специфических для мишени нуклеотидов(нуклеотид) можно добавлять для улучшения гибридизации между праймером и его последовательностью-мишенью;

смесь для ПЦР: 2,5 мкл 10× буфера для ПЦР (15 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,25 мкл 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;

Профиль термоциклирования: 4 мин при 95°C; 30× [1 мин при 95°C (денатурация) и 1 мин при температуре гибридизации и 2 мин при 72°C (элонгация)]; 5 мин при 72°C; охлаждение до 4°C. Оптимальную температуру гибридизации можно определять посредством ПЦР с градиентом температур, где температуру гибридизации можно изменять, например от 57 до 70°C в термоциклере MJ Research PTC-200 (Biozym). Оптимальная температура гибридизации для праймеров, специфических для IND дикого типа, представляет собой температуру, при которой можно детектировать четкий ПЦР-фрагмент ожидаемого размера (как описано ниже) для образца ДНК от растения Brassica дикого типа, а не для образца ДНК от мутантного растения Brassica. Оптимальная температура гибридизации для праймеров, специфических

для мутантного IND, представляет собой температуру, при которой можно детектировать четкий ПЦР-фрагмент ожидаемого размера (как описано ниже) для образца ДНК от мутантного растения Brassica, а не для образца ДНК от растения Brassica дикого типа;

после амплификации 5 мкл красителя для нанесения (оранжевый краситель) добавляют к 15 мкл образцов после ПЦР и образцы наносят в 1,5% агарозный гель;

характер полос, полученных после амплификации геномной ДНК мутантных растений Brassica, оценивают следующим образом:

данные для образцов ДНК, выделенных из материала листа мутантных растений Brassica в пределах одного проведения ПЦР и одной смеси для ПЦР не следует принимать без того, чтобы

для контрольной ДНК дикого типа был показан ПЦР-фрагмент ожидаемого размера в случае специфического для IND-Xx-WT анализа ПЦР и отсутствие ПЦР-фрагментов ожидаемого размера в случае специфического для IND-Xx-EMSXX анализа ПЦР,

для ДНК - положительного контроля был показан ПЦР-фрагмент ожидаемого размера в случае специфического для IND-Xx-EMSXX анализа ПЦР и отсутствие ПЦР-фрагментов ожидаемого размера в случае специфического для IND-Xx-WT анализа ПЦР;

дорожки без продукта ПЦР ожидаемого размера в случае специфического для IND-Xx-WT анализа ПЦР и с ПЦР-фрагментом ожидаемого размера в случае специфического для IND-Xx-EMSXX анализа ПЦР указывают на то, что соответствующее растение, из которого получена геномная ДНК-матрица, является гомозиготным по мутации IND-Xx-EMSXX;

дорожки с ПЦР-фрагментом ожидаемого размера в случае специфического для IND-Xx-WT анализа ПЦР и специфического для IND-Xx-EMSXX анализа ПЦР указывают на то, что соответствующее растение, из которого получена геномная ДНК-матрица, является гетерозиготным по мутации IND-Xx-EMSXX;

дорожки с ПЦР-фрагментом ожидаемого размера в случае специфического для IND-Xx-WT анализа ПЦР и без продукта ПЦР ожидаемого размера в случае специфического для IND-Xx-EMSXX анализа ПЦР, указывают на то, что соответствующее растение, из которого получена геномная ДНК-матрица, представляет собой растение дикого типа.

Альтернативно, можно использовать также способ Invader™ (Third Wave Agbio), чтобы отличать растения, содержащие специфическую точечную мутацию в аллеле IND, от растений, не содержащих эту специфическую точечную мутацию. Следующие дискриминирующие зонды для Invader™ были разработаны таким образом для детекции присутствия или отсутствия и статуса зиготности мутантных аллелей, идентифицированных в примере 4 (см. табл. 6).

Зонды, специфические для гена-мишени IND, мутантного или соответствующего дикого типа (обозначенные как "5' flap1-x" и "5' flap2-x", соответственно) и "инвазивные" зонды, которые можно использовать в комбинации с ними, указаны в табл. 6. В общем, каждый набор проб состоит из одного зонда, специфического для гена-мишени мутантного или дикого типа, в котором первый нуклеотид после 5'-flap-последовательности совпадает с отличающимся нуклеотидом (подчеркнутый нуклеотид в табл. 6) (так называемый "первичный зонд"; например, зонд с SEQ ID NO: 12 является специфическим для IND-A1-EMS06, и зонд с SEQ ID NO: 13 является специфическим для IND-A1-WT), и одного зонда, специфического для нуклеотидов выше отличающегося нуклеотида (так называемый "олигонуклеотид invader®"; например, зонд с SEQ ID NO: 11 является специфическим для нуклеотидов выше нуклеотида, отличающегося в IND-A1-EMS06 и IND-A1-WT). Последний нуклеотид последнего праймера может совпадать с отличающимся нуклеотидом у мутанта (как показано жирным шрифтом для нуклеотидов в табл. 6), но можно с тем же успехом использовать другие нуклеотиды для этого последнего нуклеотида, пока первичный зонд и олигонуклеотид invader® еще способны формировать перекрывание одного нуклеотида при гибридизации с ДНК-мишенью для образования специфической инвазивной структуры, узнаваемой ферментами Cleavase® (Third Wave Agbio).

Способ анализа Invader™ и интерпретацию данных осуществляют, как предписано производителем (Third Wave Agbio). Кратко, нуклеотидные последовательности, обозначенные как "flap1" и "flap2" в табл. 6, представляют собой последовательности 5'-"выступающих концов", которые отщепляются от первичных зондов на начальной стадии анализа Invader™ и которые являются комплементарными последовательностям в кассете FRET™ 1 и 2, соответственно, и не являются комплементарными последовательностям-мишеням мутантного или дикого типа. Если первичные зонды расщепляются на начальной стадии и flap1-зонд и/или flap2-зонд гибридизуются с кассетой FRET™ 1 и 2, соответственно, на второй стадии, образуется сигнал, показательный для присутствия в образце гена-мишени IND, мутантного или соответствующего дикого типа, соответственно.



Таблица 6

№ аллеля	Зонды	
IND-A1-EMS06	5' CGTAAGGGTAAGCGACGACCCCTCAGACGT 3'	(SEQ ID NO: 11)
	5' flap1-ATGGTGGCTCGTCG 3'	(SEQ ID NO: 12)
IND-A1-WT	5' CGTAAGGGTAAGCGACGACCCCTCAGACGT 3'	(SEQ ID NO: 11)
	5' flap2-GTGGTGGCTCGTC 3'	(SEQ ID NO: 13)
IND-A1-EMS09	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	(SEQ ID NO: 14)
	5' flap1-TTGGCACCATCCTCT 3'	(SEQ ID NO: 15)
IND-A1-WT	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	(SEQ ID NO: 14)
	5' flap2-CTGGCACCATCCTCT 3'	(SEQ ID NO: 16)
IND-A1-EMS13	5' CCTGCCGTTTCAAGAACTTGGTGTAGCGGATGT 3'	(SEQ ID NO: 17)
	5' flap1-ACTTCGTCGAGCATG 3'	(SEQ ID NO: 18)
IND-A1-WT	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	(SEQ ID NO: 17)
	5' flap2-GCTTCGTCGAGCATG 3'	(SEQ ID NO: 19)
IND-C1-EMS04	5' CATCCTCTTCAATATCCGGATCTTCTCGCTTATCC TTTCTCTACT 3'	(SEQ ID NO: 20)
	5' flap1-ACCGACGAGCCAC 3'	(SEQ ID NO: 21)
IND-C1-WT	5' CATCCTCTTCAATATCCGGATCTTCTCGCTTATCC TTTCTCTACT 3'	(SEQ ID NO: 20)
	5' flap2-GCCGACGAGCCAC 3'	(SEQ ID NO: 22)
IND-C1-EMS08	5' CGTAAGGGTAAGCGAGGACCCCCAGA 3'	(SEQ ID NO: 23)
	5' flap1-TGGTGGTGGCTCG 3'	(SEQ ID NO: 24)
IND-C1-WT	5' CGTAAGGGTAAGCGAGGACCCCCAGA 3'	(SEQ ID NO: 23)
	5' flap2-CGGTGGTGGCTCG 3'	(SEQ ID NO: 25)
IND-C1-EMS09	5' CGAGGACCCCCAGACGGTGGTGT 3'	(SEQ ID NO: 26)
	5' flap1-ACTCGTCGGCGTAG 3'	(SEQ ID NO: 27)
IND-C1-WT	5' CGAGGACCCCCAGACGGTGGTGT 3'	(SEQ ID NO: 26)
	5' flap2-GCTCGTCGGCGT 3'	(SEQ ID NO: 28)

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации частично нокаутированного мутантного аллеля гена IND в биологическом образце, где ген IND содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

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

(б) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 от аминокислоты в положении 16 до аминокислоты в положении 210 или SEQ ID NO: 4,

где указанный частично нокаутированный мутантный аллель включает мутацию, в результате которой белок IND содержит метионин в положении 124 последовательности SEQ ID NO: 2 вместо валина; серин в положении 146 последовательности SEQ ID NO: 2 вместо глицина; валин в положении 159 последовательности SEQ ID NO: 2 вместо аланина; метионин в положении 136 последовательности SEQ ID NO: 4 вместо треонина; треонин в положении 139 последовательности SEQ ID NO: 4 вместо аланина; или цистеин в положении 142 последовательности SEQ ID NO: 4 вместо аргинина, причем согласно указанному способу биологический образец подвергают исследованию с помощью полимеразной цепной

реакции с использованием набора по меньшей мере из двух праймеров, где указанный набор выбран из группы, состоящей из

набора праймеров, где один из указанных праймеров специфически узнает 5'-или 3'-фланкирующую область мутантного аллеля IND, а второй из указанных праймеров специфически узнает область мутации мутантного аллеля IND;

набора праймеров, где один из указанных праймеров специфически узнает 5'-или 3'-фланкирующую область мутантного аллеля IND, а второй из указанных праймеров специфически узнает область стыка между 3'- или 5'-фланкирующей областью и областью мутации мутантного аллеля IND, соответственно, и где

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 929 или от нуклеотида 931 до нуклеотида 1622, или последовательность, комплементарную указанной; область мутации соответствует нуклеотиду в положении 930 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной ей последовательности; и указанная область стыка содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 930 или от нуклеотида 930 до нуклеотида 1622, или последовательность, комплементарную указанной; или

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 995 или от нуклеотида 997 до нуклеотида 1622, или последовательность, комплементарную указанной; область мутации соответствует нуклеотиду в положении 996 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной ей последовательности; и указанная область стыка содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 996 или от нуклеотида 996 до нуклеотида 1622, или последовательность, комплементарную указанной; или

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 1035 или от нуклеотида 1037 до нуклеотида 1622, или последовательность, комплементарную указанной; область мутации соответствует нуклеотиду в положении 1036 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной последовательности; и указанная область стыка содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 1036 или от нуклеотида 1036 до нуклеотида 1622, или последовательность, комплементарную указанной; или

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 902 или от нуклеотида 904 до нуклеотида 1593, или последовательность, комплементарную указанной; область мутации соответствует нуклеотиду в положении 903 SEQ ID NO: 7 или в комплементарной ей последовательности; и указанная область стыка содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 903 или от нуклеотида 903 до нуклеотида 1593, или последовательность, комплементарную указанной; или

5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 910 или от нуклеотида 912 до нуклеотида 1593, или последовательность, комплементарную указанной; область мутации соответствует нуклеотиду в положении 911 SEQ ID NO: 7, или в комплементарной ей последовательности; и указанная область стыка содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 911 или от нуклеотида 911 до нуклеотида 1593, или последовательность, комплементарную указанной; или

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 919 или от нуклеотида 921 до нуклеотида 1593, или последовательность, комплементарную указанной; область мутации соответствует нуклеотиду в положении 920 SEQ ID NO: 7 или в комплементарной ей последовательности; и указанная область стыка содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 920 или от нуклеотида 920 до нуклеотида 1593, или последовательность, комплементарную указанной.

2. Способ идентификации частично нокаутированного мутантного аллеля гена IND в биологическом образце, где ген IND содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(a) нуклеотидной последовательности, содержащей последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 от нуклеотида в положении 46 до нуклеотида в положении 633, или идентична SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 7; и

(b) нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4 от аминокислоты в положении 16 до аминокислоты в положении 210, или SEQ ID NO: 4,

где указанный частично нокаутированный мутантный аллель включает мутацию, в результате которой белок IND содержит метионин в положении 124 последовательности SEQ ID NO: 2 вместо валина; серин в положении 146 последовательности SEQ ID NO: 2 вместо глицина; валин в положении 159 последовательности SEQ ID NO: 2 вместо аланина; метионин в положении 136 последовательности SEQ ID NO: 4 вместо треонина; треонин в положении 139 последовательности SEQ ID NO: 4 вместо аланина; или цистеин в положении 142 последовательности SEQ ID NO: 4 вместо аргинина,

причем согласно указанному способу биологический образец подвергают гибридизации с использованием по меньшей мере одного специфического зонда или набора специфических зондов, выбранных



вательность SEQ ID NO: 15;

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 1035 или от нуклеотида 1037 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанной; область мутации соответствует нуклеотиду в положении 1036 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной ей последовательности; и указанная область стыка содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 1036 или от нуклеотида 1036 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанной, а указанный набор зондов содержит один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 17, и один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 18;

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 919 или от нуклеотида 921 до нуклеотида 1593 или последовательность, комплементарную указанной; область мутации соответствует нуклеотиду в положении 920 SEQ ID NO: 7 или в комплементарной ей последовательности; и указанная область стыка содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 920 или от нуклеотида 920 до нуклеотида 1593 или последовательность, комплементарную указанной, а указанный набор зондов содержит один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 20, и один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 21;

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 902 или от нуклеотида 904 до нуклеотида 1593 или последовательность, комплементарную указанной; область мутации соответствует нуклеотиду в положении 903 SEQ ID NO: 7 или в комплементарной ей последовательности; и указанная область стыка содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 903 или от нуклеотида 903 до нуклеотида 1593 или последовательность, комплементарную указанной, а указанный набор зондов содержит один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 23, и один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 24;

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 910 или от нуклеотида 912 до нуклеотида 1593 или последовательность, комплементарную указанной; область мутации соответствует нуклеотиду в положении 911 SEQ ID NO: 7 или в комплементарной ей последовательности; и указанная область стыка содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 911 или от нуклеотида 911 до нуклеотида 1593 или последовательность, комплементарную указанной, а указанный набор зондов содержит один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 26, и один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 27.

4. Способ определения статуса зиготности частично нокаутированного мутантного аллеля гена IND), идентифицированного способом по п.1, в растении или его клетке, части, семени или потомстве, включающий выявление аллеля IND дикого типа и мутантного аллеля IND с помощью определения специфической области мутантного IND и/или IND дикого типа в геномной ДНК указанного растения, или его клетки, части, семени или потомства, причем согласно указанному способу геномную ДНК указанного растения, или его клетки, части, семени или потомства подвергают исследованию с помощью полимеразной цепной реакции с использованием набора по меньшей мере из двух или по меньшей мере из трех праймеров, где по меньшей мере два из указанных праймеров специфически узнают аллель IND дикого типа и указанные по меньшей мере два праймера выбраны из группы, состоящей из

первого праймера, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, и второго праймера, который специфически узнает область мутации аллеля IND дикого типа;

первого праймера, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, и второго праймера, который специфически узнает область стыка между 3'- или 5'-фланкирующей областью и областью мутации аллеля IND дикого типа, соответственно, и

где по меньшей мере два из указанных праймеров специфически узнают мутантный аллель IND, и выбраны из группы, состоящей из

первого праймера, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, и третьего праймера, который специфически узнает область мутации мутантного аллеля IND;

первого праймера, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, и третьего праймера, который специфически узнает область стыка между 3'- или 5'-фланкирующей областью и областью мутации мутантного аллеля IND, соответственно, и где

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 929 или от нуклеотида 931 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанной; область мутации аллеля IND дикого типа соответствует нуклеотиду в положении 930 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной ей последовательности; область мутации мутантного аллеля IND содержит нуклеотид а в положении, соответствующем нуклеотиду 930 SEQ ID NO: 5, или в комплементарной ей последовательности; указанная область стыка аллеля IND дикого типа со-



область стыка мутантного аллеля IND содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 919 с последующим t или t с последующей нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 921 до нуклеотида 1593 или последовательность, комплементарную указанным.

5. Способ определения статуса зиготности частично нокаутированного мутантного аллеля гена IND), идентифицированного способом по п.1, в растении или его клетки, части, семени или потомства, включающий выявление аллеля IND дикого типа и мутантного аллеля IND с помощью определения специфической области мутантного IND и/или IND дикого типа в геномной ДНК указанного растения, или его клетки, части, семени или потомства, причем согласно указанному способу геномную ДНК указанного растения или его клетки, части, семени или потомства подвергают анализу гибридизацией с использованием набора по меньшей мере из двух специфических зондов, где указанные зонды специфически узнают аллель IND дикого типа и выбраны из группы, состоящей из

первого зонда, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND дикого типа, и второго зонда, который специфически узнает область мутации аллеля IND дикого типа;

первого зонда, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND дикого типа, и второго зонда, который специфически узнает область стыка между 3'- или 5'-фланкирующей областью и областью мутации аллеля IND дикого типа, соответственно;

зонда, который специфически узнает область стыка между 5'- или 3'-фланкирующей областью и областью мутации аллеля IND дикого типа, и

где по меньшей мере один из указанных зондов, специфически узнающий мутантный аллель IND, выбран из группы, состоящей из

первого зонда, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область мутантного аллеля IND, и третьего зонда, который специфически узнает область мутации мутантного аллеля IND;

первого зонда, который специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область мутантного аллеля IND, и третьего зонда, который специфически узнает область стыка между 5'- или 3'-фланкирующей областью и областью мутации мутантного аллеля IND;

зонда, который специфически узнает область стыка между 5'- или 3'-фланкирующей областью и областью мутации мутантного аллеля IND, и где

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 929 или от нуклеотида 931 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанным; область мутации аллеля IND дикого типа соответствует нуклеотиду в положении 930 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной ей последовательности; область мутации мутантного аллеля IND содержит нуклеотид а в положении, соответствующем нуклеотиду 930 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной ей последовательности; указанная область стыка аллеля IND дикого типа содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 930 или от нуклеотида 930 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанным; и указанная область стыка мутантного аллеля IND содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 929 с последующим а или а с последующей нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 931 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанным; или

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 995 или от нуклеотида 997 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанным; область мутации аллеля IND дикого типа соответствует нуклеотиду в положении 996 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной ей последовательности; область мутации мутантного аллеля IND содержит нуклеотид а в положении, соответствующем нуклеотиду в положении 996 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной ей последовательности; указанная область стыка аллеля IND дикого типа содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 996 или от нуклеотида 996 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанным; и указанная область стыка мутантного аллеля IND содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 995 с последующим а или а с последующей нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 997 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанным; или

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 1035 или от нуклеотида 1037 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанным; область мутации аллеля IND дикого типа соответствует нуклеотиду в положении 1036 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной ей последовательности; область мутации мутантного аллеля IND содержит нуклеотид t в положении, соответствующем положению 1036 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной ей последовательности; указанная область стыка аллеля IND дикого типа содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 1036 или от нуклеотида 1036 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанным; и указанная область стыка мутантного аллеля IND содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 1035 с последующим t или t с последующей нуклеотидной последова-









держит один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 23, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 24;

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 910 или от нуклеотида 912 до нуклеотида 1593 или последовательность, комплементарную указанной; область мутации соответствует нуклеотиду в положении 911 SEQ ID NO: 7 или в комплементарной ей последовательности; и указанная область стыка содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 911 или от нуклеотида 911 до нуклеотида 1593 или последовательность, комплементарную указанной; а указанный набор зондов содержит один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 26, и/или один зонд, содержащий последовательность из SEQ ID NO: 27.

10. Набор для определения статуса зиготности частично нокаутированного мутантного аллеля гена IND, идентифицированного способом по п.1, в растении или его клетке, части, семени или потомстве, содержащий набор праймеров для определения присутствия аллеля IND дикого типа или мутантного аллеля IND, где по меньшей мере два из указанных праймеров специфически узнают аллель IND дикого типа и где по меньшей мере два из указанных праймеров специфически узнают мутантный аллель IND, выбранный из группы, состоящей из

набора по меньшей мере из трех праймеров, где первый праймер специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, второй праймер специфически узнает область мутации мутантного аллеля IND, и третий праймер или зонд специфически узнает область мутации аллеля IND дикого типа; и

набора по меньшей мере из трех праймеров, где первый праймер специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, второй праймер специфически узнает область стыка между 3'- или 5'-фланкирующей областью и областью мутации мутантного аллеля IND, соответственно

и третий праймер специфически узнает область стыка между 3'- или 5'-фланкирующей областью и областью мутации аллеля IND дикого типа, соответственно, и где 5'- или 3'-фланкирующие области, области мутаций и области стыка раскрыты в п.1.

11. Набор для определения статуса зиготности частично нокаутированного мутантного аллеля гена IND), идентифицированного способом по п.1, в растении или его клетке, части, семени или потомстве, содержащий набор зондов, где по меньшей мере один из указанных зондов специфически узнает аллель IND дикого типа и где по меньшей мере один из указанных зондов специфически узнает мутантный аллель IND, выбранный из группы, состоящей из

набора по меньшей мере из трех зондов, где первый зонд специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, второй зонд специфически узнает область мутации мутантного аллеля IND, а третий зонд специфически узнает область мутации аллеля IND дикого типа;

набора по меньшей мере из трех зондов, где первый зонд специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, второй зонд специфически узнает область стыка между 3'- или 5'-фланкирующей областью и областью мутации мутантного аллеля IND, соответственно, и третий зонд специфически узнает область стыка между 3'- или 5'-фланкирующей областью и областью мутации аллеля IND дикого типа, соответственно;

набора по меньшей мере из двух зондов, где первый зонд специфически узнает область стыка между 5'- или 3'-фланкирующей областью и областью мутации мутантного аллеля IND, второй зонд специфически узнает область стыка между 5'-или 3'-фланкирующей областью и областью мутации аллеля IND дикого типа,

и где 5'- или 3'-фланкирующие области, области мутаций и области стыка раскрыты в п.1.

12. Набор по п.11, где первый зонд специфически узнает 5'- или 3'-фланкирующую область аллеля IND мутантного и дикого типа, второй зонд специфически узнает область стыка между 3'- или 5'-фланкирующей областью и областью мутации мутантного аллеля IND, соответственно, и третий зонд специфически узнает область стыка между 3'- или 5'-фланкирующей областью и областью мутации аллеля IND дикого типа, соответственно, а указанный набор по меньшей мере из трех специфических зондов выбран из группы, состоящей из:

указанная 5'- или 3'-фланкирующая область содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 929 или от нуклеотида 931 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанной; область мутации аллеля IND дикого типа соответствует нуклеотиду в положении 930 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной ей последовательности; область мутации мутантного аллеля IND содержит нуклеотид а в положении, соответствующем нуклеотиду 930 SEQ ID NO: 5 или в комплементарной ей последовательности; указанная область стыка аллеля IND дикого типа содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 930 или от нуклеотида 930 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указанной; и указанная область стыка мутантного аллеля IND содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 1 до нуклеотида 929 с последующим а или а с последующей нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5 от нуклеотида 931 до нуклеотида 1622 или последовательность, комплементарную указан-



в положении 911 SEQ ID NO: 7 или в комплементарной ей последовательности; область мутации мутантного аллеля IND содержит нуклеотид а в положении, соответствующем нуклеотиду 911 SEQ ID NO: 7 или в комплементарной ей последовательности; указанная область стыка аллеля IND дикого типа содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 911 или от нуклеотида 911 до нуклеотида 1593 или последовательность, комплементарную указанной; и указанная область стыка мутантного аллеля IND содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 1 до нуклеотида 910 с последующим а или а с последующей нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 7 от нуклеотида 912 до нуклеотида 1593 или последовательность, комплементарную указанной, где указанный набор зондов содержит один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 26, один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 27, и/или один зонд, содержащий последовательность SEQ ID NO: 28.

