



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0038086

(51)<sup>7</sup> C12N 15/29; A01H 5/00; C12N 5/04;  
A01H 1/00; A01H 5/10

(13) B

(21) 1-2018-05901

(22) 19/05/2017

(86) PCT/EP2017/062093 19/05/2017

(87) WO2017/202715 30/11/2017

(30) 16171462.1 26/05/2016 EP

(45) 25/01/2024 430

(43) 25/03/2019 372A

(73) NUNHEMS B.V. (NL)

Napoleonsweg 152, 6083 AB Nunhem, Netherlands

(72) SIRIZZOTTI, Alberto (IT); BERENTSEN, Richard, Bernard (NL); VRIEZEN, Hendrik, Willem (NL).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) TẾ BÀO CÂY DƯA HẦU CÓ HOẠT TÍNH PROTEIN TƯƠNG TỰ XYCLIN SDS GIẢM SO VỚI TẾ BÀO CÂY DƯA HẦU KIỂU ĐẠI TƯƠNG ỨNG, CÂY DƯA HẦU CHỨA TẾ BÀO NÀY, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY DƯA HẦU, CÁC PHẦN CỦA CÂY DƯA HẦU, VẬT LIỆU NHÂN GIỐNG LIÊN QUAN, HẠT VÀ QUẢ, VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA QUẢ KHÔNG HẠT

(57) Sáng chế đề cập đến tế bào thực vật có hoạt tính protein tương tự xyclin SDS giảm so với tế bào thực vật kiểu đại tương ứng, thực vật chứa tế bào thực vật này, phương pháp tạo ra thực vật, các phần của thực vật, vật liệu nhân giống liên quan, hạt và quả, và phương pháp tạo ra quả không hạt.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến thực vật tạo ra quả không hạt. Sáng chế cũng bao gồm phương pháp tạo ra thực vật này và sử dụng axit nucleic mã hóa protein tương tự xyclin SDS để tạo ra quả không hạt.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Hầu hết quả không hạt thương mại được tạo ra từ thực vật mà quả của nó thường chứa tương đối nhiều hạt cứng lớn được phân bố trong toàn bộ thịt quả. Các quả không hạt được biết đến như là dưa hấu, cà chua, dưa chuột, cà tím, nho, chuối, quả có múi, như cam, chanh và chanh lá cam. Do việc tiêu thụ quả không hạt thường dễ hơn và thuận tiện hơn, chúng được coi là có giá trị.

Quả thường bắt đầu phát triển khi một hoặc nhiều tế bào trứng trong bầu noãn của hoa được thụ phấn bởi hạt tinh trùng từ phấn.

Quả không hạt có thể tạo thành từ hai hiện tượng khác nhau. Trong một số trường hợp, quả phát triển mà không cần sự thụ tinh của noãn bằng phấn hoa, hiện tượng còn được biết đến như là tạo quả mà không cần thụ tinh. Trong các trường hợp khác, quả không hạt xảy ra sau khi thụ phấn khi sự phát triển của hạt (phôi và/hoặc nội nhũ) bị ức chế hoặc hạt chết sớm, trong khi phần còn lại của quả vẫn tiếp tục phát triển (hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả). Ngược lại với tạo quả mà không cần thụ tinh, hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả cần sự thụ phấn để khởi đầu sự phát triển của quả.

Quả cam không hạt là ví dụ về tạo quả mà không cần thụ tinh. Một số giống

cam (chẳng hạn Navel) không sản sinh ra phần hoa hữu thụ. Tuy nhiên, chúng có thể được thụ phấn chéo với phần hoa từ các giống khác. Trong trường hợp chỉ có giống đực không có khả năng sinh sản được trồng trong vườn cây ăn quả, ở đó sẽ không có sự thụ phấn và quả không hạt không cần thụ tinh sẽ được tạo ra. Sự nhân giống các cây cam tương ứng thường được thực hiện bằng cách cắt sau đó ghép cành với một thân rễ khác.

Chuối không hạt là thể tam bội. Mặc dù sự thụ phấn trong một số trường hợp có thể là bình thường và, đa số chuối là không hạt. Điều này được giải thích bởi bộ nhiễm sắc thể hay thay đổi (3x) dẫn đến sự phân chia không đúng các nhiễm sắc thể trong quá trình phân bào giảm nhiễm và kết quả là tạo ra phần hoa bất thụ. Không có sự thụ tinh, chuối tam bội cũng có thể được tạo ra và phát triển thành quả không hạt. Thậm chí khi xảy ra hiện tượng thụ phấn, nhiều nhất là một trong ba trăm quả chứa một vài hạt. Điều này có thể là do phần thể tam bội trở nên bất thụ, do những lý do đã được giải thích. Vì vậy, cây chuối nhìn chung có thể được xem như là cây tạo quả không cần thụ tinh. Cây chuối thường được nhân giống vô tính từ chồi bên hoặc chồi rễ mọc ở gốc của thân chính, có thể được lấy ra và trồng lại để tiếp tục việc trồng trọt. Người trồng cũng nhân giống chuối bằng cách nuôi cấy mô, đặc biệt là để sản xuất ra các nguyên liệu không sâu bệnh.

Dưa chuột không hạt, bí không hạt và cà tím không hạt là ví dụ về các cây trồng có thể tạo ra quả không hạt mà không cần thụ phấn (hiện tượng tạo quả không hạt mà không cần thụ tinh), chẳng hạn trong các điều kiện mà ở đó sự thụ phấn bị suy giảm (chẳng hạn nhiệt độ thấp). Tuy nhiên, quả với chất lượng thương mại có thể được tạo ra trong các điều kiện này. Tuy nhiên, tất cả các cây trồng này có thể tạo ra quả có hạt nhờ thụ phấn. Vì vậy, các cây trồng này là các cây tạo quả không hạt tùy ý không cần thụ tinh. Việc nhân giống các cây trồng này có thể được thực hiện bằng cách tự thụ phấn hoặc thụ phấn chéo, nhân giống *in vitro*, và ghép cành.

Từ các thể đột biến của cà chua, cũng đã biết rằng chúng có thể tạo ra quả không hạt trong các điều kiện mà ở đó sự thụ phấn/thụ tinh thông thường bị suy giảm (chẳng hạn trong các trường hợp nhiệt độ thấp). Vì vậy, những thể đột biến này cũng tạo quả không hạt tùy ý không cần thụ tinh. Các thể đột biến đã biết thể hiện kiểu hình

này là *pat*, *pat-2* và hệ *pat-3/pat-4*. Các gen thuộc những thể đột biến này là chưa biết và hệ *pat-3/pat-4* dường như là phụ thuộc vào nhiều locus.

Hiện tượng tạo quả không hạt không cần thụ tinh cũng được đưa vào một số loài cây bằng cách biến đổi gen. Sự viều hiện của enzym tryptophan monooxygenaza (*iaaM*) ở vi khuẩn gây ra sự tổng hợp auxin dưới sự điều khiển của gen khởi đầu *DefH9* đặc hiệu noãn và thực giá noãn đã gây ra sự tạo quả không hạt không cần thụ tinh ở dưa chuột (Yin et al., 2006, Clular & molecular Biotech. Letters 11, 279-290), cà tím (Acciarri et al., 2002, BMC Biotech. 2(4)), cà chua (Rotino et al., 2005, BMC Biotech. 5(32)) và thuốc lá.

Các cây chuyển gen này chứng tỏ tầm quan trọng của hormon thực vật trong quá trình phát triển hạt và quả. Sự phát triển hạt và quả được kiểm soát chặt chẽ bởi một số hormon thực vật bên cạnh những yếu tố khác là đã biết trong lĩnh vực. Sự tạo quả không hạt không cần thụ tinh, bao gồm kết quả về mặt logic là sự không có hạt của quả, cũng có thể được gây ra bởi việc sử dụng các hormon thực vật ngoại sinh chẳng hạn, cụ thể là auxin hoặc gibberellin (Ruan et al., Trends in Plant Sci. 17(11), 1360-1385).

Dưa hấu không hạt được tạo ra bởi người gây giống là các ví dụ về cây trồng mà hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả. Các cây dưa hấu thông thường là lưỡng bội ( $2n$ ). Dưa hấu tạo quả không hạt là cây lai được tạo ra bằng cách lai chéo cây dưa hấu lưỡng bội ( $2n$ ) đực với cây dưa hấu tứ bội ( $4n$ ) cái. Hạt lai F1 tạo thành là tam bội ( $3n$ ). Để tạo quả cho cây lai F1 cần phải thụ phấn. Do cây lai F1 tam bội ( $3n$ ) không tạo ra hạt phấn hữu thụ, cái gọi là cây thụ phấn hoặc cây làm thụ phấn phải được trồng trên cùng một cánh đồng. Cây thụ phấn là lưỡng bội ( $2n$ ). Thông thường, tỷ lệ giữa cây làm thụ phấn và cây lai bằng khoảng 1 : 3 cần phải được trồng theo một sơ đồ cho trước để tạo ra phấn hoa đủ để thụ phấn cho tất cả các cây lai F1. Sự thụ phấn chéo giữa cây thụ phấn lưỡng bội ( $2n$ ) và hoa của cây lai tam bội ( $3n$ ) cái gây ra sự tạo quả và dẫn đến sự tạo thành của các quả tam bội không hạt trên cây lai tam bội. Các cây bố mẹ lưỡng bội ( $2n$ ) và tứ bội ( $4n$ ) của cây lai F1 mỗi cây tạo ra quả có hạt và cả hai có thể được nhân giống độc lập với nhau bằng cách tự thụ phấn.

Nho không hạt có thể được sản xuất từ cây tạo quả không cần thụ tinh hoặc cây tạo quả không hạt do hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả. Giống Black Corinth là giống tạo quả không cần thụ tinh, trong khi Sultanina là giống tạo quả không hạt do hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả. Cây nho nhìn chung được nhân giống bằng cách cắt cành và ghép cành lần lượt vào một thân rễ khác.

Tính không đồng đều trong phân bào giảm nhiễm cũng là một yếu tố khiến cho cây tạo quả không hạt. Ví dụ về cây tạo ra quả không hạt được nêu trong tài liệu của Zhang và đồng tác giả (2012, *Scientia Horticulture* 140, 107-114), bộc lộ dưa hấu không hạt. Thể đột biến vô tính đực và cái (male and female sterile - MFS) thu được từ thế hệ con của cây lai F1 sau khi chiếu xạ hạt của nó bằng tia gama. Phần hoa từ thể đột biến MFS là không hề hữu thụ. Quả không hạt được tạo ra bởi các cây MFS, khi được thụ phấn với phấn từ cây hữu thụ đực. Vì vậy, cây dưa hấu MFS có thể được phân loại là cây tạo quả không hạt do hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả. Noãn cũng gần như hoàn toàn bất thụ, do hầu như không có hạt nào được tạo ra nhờ sự thụ phấn chéo của thể đột biến MFS với phấn từ các cây hữu thụ khác. Kỳ tiếp hợp không hoàn toàn và sự phân chia bất thường của thanh nhiễm sắc trong quá trình phân bào giảm nhiễm được quan sát ở thể đột biến MFS và được nhận thấy là nguyên nhân gây ra sự bất thụ đực và cái. Các gen chịu trách nhiệm cho những ảnh hưởng có mặt trong thể đột biến MFS chưa được xác định nhưng dường như là kiểu hình này trong thể đột biến MFS là do một gen lặn duy nhất.

Pradillo và đồng tác giả (2014, *Frontiers in Plant Sci.* 5, Article 23, doi: 10.3389/fpls.2014.00023) xem xét lại kiến thức trước đây về các gen tham gia vào sự tái tổ hợp tương đồng trong quá trình phân bào giảm nhiễm ở *Arabidopsis*.

Azumi và đồng tác giả (2002, *EMBO J.* 21(12), 3081-3095) mô tả sự phân lập thể đột biến *Arabidopsis* có khiếm khuyết trong kỳ tiếp hợp và sự hình thành hóa trị hai trong quá trình phân bào giảm nhiễm của giống đực và các khiếm khuyết tương tự, mặc dù ở mức độ ít hơn, trong quá trình phân bào giảm nhiễm ở giống cái. Sự đột biến được gọi là “*Solo Dancers*” (*sds*) và được chỉ ra là bắt nguồn từ một gen lặn duy nhất. Thể đột biến SDS là bất thụ đực và bị suy giảm mạnh về khả năng thụ tinh với giống cái. Các cây đồng hợp tử đối với sự đột biến *sds* là bất thụ đực nhưng ít nhất hữu thụ

cái ở mức độ nhỏ, được chứng minh bởi sự thụ phấn chéo của cây đột biến *sds* với phấn hoa từ cây hữu thụ đực. Vì vậy, thể đột biến SDS là bất thụ đực và suy giảm mạnh về tính hữu thụ cái. Gen *sds* được nhận biết là gen mã hóa protein kiểu cyclin và đã được chứng minh là tương tác với các protein *Arabidopsis* CDKs, Cdc2a và Ccdc2b. Tuy nhiên, SDS đã được nhận biết là protein kiểu cyclin mới chưa được biết đến trước đây. De Muyt và đồng tác giả (2009, PLOS genet. 5(9) e1000654, doi: 10.1371/journal.pgen.1000654) xác nhận rằng thể đột biến *sds* *Arabidopsis* có khiếm khuyết tái tổ hợp trong phân bào giảm nhiễm và gợi ý rằng khiếm khuyết này là do sự định vị sai của một protein khác (AtDMC1) ở các tế bào trong quá trình phân bào giảm nhiễm.

Từ thảo luận nêu trên, hiển nhiên là các yếu tố xác định xem liệu cây có tạo quả không hạt hay không là nhiều loại và có thể tập trung vào một số nguyên nhân, chẳng hạn hình thái học, sinh lý học và/hoặc di truyền học.

Để tạo ra quả không hạt ở cây tạo quả không hạt do hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả, phấn hoa cái của cây cần phải được thụ phấn. Cây trồng tạo quả không hạt do hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả được trồng hiện nay là bất thụ đực. Kết quả là, bên cạnh cây đực, một cây hữu thụ đực khác (cây thụ phấn hoặc cây làm thụ phấn) cần được trồng thêm trong cùng một cánh đồng. Do diện tích được dùng cho các cây thụ phấn được tính vào diện tích cần dùng sẵn có đối với cây đực tạo quả không hạt, năng suất tính trên mỗi diện tích canh tác là giảm. Nhìn chung, các cây thụ phấn là các cây bình thường mà cũng có thể được tự thụ phấn. Quả được tạo ra bởi các cây thụ phấn tuy nhiên quả này lại tạo ra hạt. Ở dưa hấu, cây thụ phấn thường là lưỡng bội ( $2n$ ), mà nhờ sự tự thụ phấn tạo ra quả có hạt, trong một số trường hợp cũng được thu hoạch và bán riêng rẽ (xem WO2012069539). Vì lý do thương mại, các quả có hạt từ các cây thụ phấn này cần phải không được trộn lẫn với quả không hạt. Vì vậy, cần phải đảm bảo rằng quả không hạt và quả có hạt được tách riêng trong khi hoặc sau khi thu hoạch, mà chúng có thể khiến cho việc thu hoạch bằng máy trở nên khó khăn hoặc không thể hoặc đòi hỏi một bước xử lý tiếp theo sau khi thu hoạch. Những biện pháp phòng ngừa bổ sung này được thực hiện sẽ làm tăng chi phí đầu vào của sản xuất quả không hạt. Ngoài ra, các cây thụ phấn được phát triển

tới mức mà chúng ra hoa và tạo ra phần có thể đủ tồn tại ở cùng thời điểm cây đực ra hoa và đầu nhụy của nó có thể nhận phần để gây ra sự đậu quả. Vì vậy, cây thụ phấn cần phải phù hợp với cây đực tạo quả không hạt cả về thời gian ra hoa và thời gian thụ tinh. Nếu thời gian ra hoa của cây thụ phấn và cây đực tương ứng về cơ bản không đồng thời, sự thụ phấn sẽ không xảy ra hoặc chỉ xảy ra với lượng không đủ. Kết quả là, ít quả được tạo ra bởi cây đực tạo quả không hạt do hạt bị thui trong quá trình phát triển của quả. Hơn nữa, trước đây đã biết rằng các điều kiện thời tiết, như mưa, nóng v.v., có thể làm cho sự sản sinh phần của cây thụ phấn khác về thời gian so với thời gian thụ tinh bởi đầu nhụy của cây đực khác kiểu gen. Vì vậy, các điều kiện thời tiết cũng có thể dẫn đến sự không đồng bộ về thời gian thụ tinh của cây thụ phấn và cây đực, ảnh hưởng làm giảm sản lượng.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Thực vật theo sáng chế mà được mô tả dưới đây không có các bất lợi tương ứng.

Vì vậy, một mục tiêu của sáng chế là khắc phục được những bất lợi của thực vật tạo ra quả không hạt hiện được canh tác.

Trong quá trình thụ phấn cây dưa hấu lưỡng bội M2 đã được gây đột biến, đã quan sát thấy một cây tạo ra quả không hạt. Cây đột biến này được gọi là EMB1. Bất ngờ là, phần của cây này có thể được sử dụng để tạo ra các cây lai ngược. Vì vậy, ngược với thực vật tạo ra quả không hạt đã biết trước đây, thực vật được mô tả trong sáng chế là hữu thụ đực. Các cây lai ngược được tự thụ phấn và 25% cây thu được từ đó tạo ra quả không hạt. Alen đột biến (*emb1*) được nhận dạng, alen này gây ra kiểu hình quả không hạt, nghĩa là khi các cây lưỡng bội đồng hợp tử đối với *emb1* (*emb1/emb1*) tự thụ phấn hoặc được thụ phấn bởi phấn từ một cây khác, chúng tạo ra quả lưỡng bội không hạt. Vì vậy, kiểu hình quả không hạt xảy ra ở thực vật đồng hợp tử đối với đột biến lặn ở alen *emb1*. Protein kiểu đại được mã hóa bởi alen kiểu đại tương ứng với alen đột biến *emb1* theo sáng chế có một số điểm tương tự nhưng cũng khác biệt đáng kể với protein xyclin SDS và vì vậy được gọi là “protein tương tự xyclin SDS”. Tính đồng nhất về mặt trình tự giữa protein xyclin SDS và các trình tự

axit nucleic mã hóa nó đã biết trước đây và các trình tự tương ứng của protein tương tự xylin SDS được bộc lộ ở đây là kém. Liên quan đến tác dụng kiểu hình ở thực vật, các thực vật đã biết trước đây, mang đột biến ở protein xylin SDS, có kiểu hình bất thụ đực, trong khi các thực vật được mô tả trong sáng chế, mang đột biến ở protein tương tự xylin SDS, là hữu thụ đực.

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề cập đến tế bào thực vật, các phần của thực vật và thực vật, đặc trưng ở chỗ tế bào thực vật hoặc thực vật có hoạt tính protein tương tự xylin SDS giảm so với tế bào thực vật và thực vật chứa protein chức năng tương tự xylin SDS kiểu dại.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1: quả dưa hấu từ thực vật kiểu dại (1A), quả từ thực vật kiểu dại so với quả từ thực vật đột biến EMB1 (1B), việc gây cam của quả không hạt từ thực vật đột biến EMB1 (1C) và hạt không phôi ở dạng mở của thực vật đột biến EMB1 (1D).

Fig. 2: So sánh sắp thẳng hàng trình tự các trình tự thu được đối với các mẫu số 114, 115, 116 và 117. Số ở phía trên bên tay phải chỉ ra vị trí nucleotit trong trình tự tương ứng như được chỉ ra trong SEQ NO 1. Các mẫu số 116 và 117 thu được từ thực vật đột biến EMB1. Các mẫu số 114 và 115 thu được từ thực vật kiểu dại.

Fig. 3: Phân tích điện di các sản phẩm PCR thu được từ cADN của các mẫu số 114, 115, 116 và 117 trên gel polyacrylamit. Các mẫu số 114 và 115 thu được từ thực vật kiểu dại. Các mẫu số 116 và 117 thu được từ thực vật đột biến EMB1.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Trong ngữ cảnh của sáng chế này, “protein tương tự xylin SDS” sẽ được hiểu có nghĩa là protein mà, khi hoạt tính của nó giảm hoặc sự biểu hiện của nó bị loại bỏ hoàn toàn ở thực vật (chẳng hạn ở thực vật đồng hợp tử đối với trình tự nucleotit đột biến mã hóa protein tương tự xylin SDS), dẫn đến hạt phấn hữu thụ đực được tạo ra bởi thực vật đó nhưng đồng thời dẫn đến sự tạo thành quả không hạt của thực vật này, khi tự thụ phấn.

Trong ngữ cảnh của sáng chế này, “hoạt tính giảm” của một protein có nghĩa là sự giảm hoạt tính của protein tương tự xyclin SDS so với tế bào thực vật kiểu đại tương đương hoặc thực vật kiểu đại tương đương. Theo một khía cạnh, việc giảm sẽ bao gồm loại bỏ hoàn toàn sự biểu hiện gen, hoặc tạo ra protein tương tự xyclin SDS mất chức năng hoặc giảm chức năng, chẳng hạn protein tương tự SDS dạng cắt cụt có thể mất chức năng hoặc giảm chức năng. Sự giảm hoạt tính có thể là giảm sự biểu hiện của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS (còn được đề cập đến như là loại bỏ), hoặc loại bỏ sự biểu hiện của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS và/hoặc làm giảm về số lượng protein tương tự xyclin SDS trong tế bào hoặc làm giảm chức năng hoặc mất chức năng hoạt tính enzym của protein tương tự xyclin SDS trong tế bào.

“Loại bỏ” hoặc “loại bỏ hoàn toàn” sẽ được hiểu là sự biểu hiện của gen tương ứng không thể phát hiện được nữa.

“Mất chức năng (về hoạt tính enzym)” trong ngữ cảnh sáng chế này có nghĩa là protein, mặc dù có mặt với lượng bằng hoặc tương tự với protein kiểu đại tương ứng, nhưng không hề có hiệu quả, nghĩa là các alen đột biến khi có mặt ở dạng đồng hợp tử ở cây lưỡng bội, cây này là hữu thụ được nhưng chỉ tạo ra quả không hạt nhờ thụ phấn. Thuật ngữ “không chức năng” và “mất hoạt tính” sẽ có cùng nghĩa như “mất chức năng”. Cả ba thuật ngữ này trong bản mô tả này được sử dụng thay cho nhau. Vì vậy, khi đề cập đến gen tương tự xyclin SDS mã hóa protein không chức năng, gen này có thể được biểu hiện, nhưng protein được mã hóa không có chức năng, chẳng hạn do protein này bị cắt cụt hoặc bao gồm một hoặc nhiều sự thay thế, sự cài xen hoặc sự khuyết đoạn axit amin so với protein tương tự SDS kiểu đại.

“Giảm chức năng (về hoạt tính enzym)” hoặc “chức năng giảm” trong ngữ cảnh sáng chế này có nghĩa là protein này mặc dù có mặt với lượng bằng hoặc tương tự với protein kiểu đại tương ứng, nhưng không hề có hiệu quả, nghĩa là khi có mặt ở dạng đồng hợp tử ở cây lưỡng bội, cây này là hữu thụ được nhưng chỉ tạo ra quả không hạt nhờ thụ phấn.

“Miền bảo toàn” dùng để chỉ các miền protein được bảo toàn, như các miền

Xyclin\_N (pfam00134) và Xyclin\_C (pfam02984). Chẳng hạn, các miền này có thể được tìm thấy trong Dữ liệu về miền bảo toàn của NCBI (trang web toàn cầu: [ncbi.nlm.nih.gov/cdd](http://ncbi.nlm.nih.gov/cdd)).

“Thế hệ M1” hoặc “thực vật M1” trong ngữ cảnh của sáng chế này dùng để chỉ thế hệ thứ nhất mà được tạo ra trực tiếp từ quá trình xử lý đột biến. Chẳng hạn, thực vật được trưởng thành từ hạt được xử lý bằng tác nhân gây đột biến là ví dụ điển hình của thế hệ M1.

“Thế hệ M2” hoặc “thực vật M2” trong bản mô tả này sẽ dùng để chỉ thế hệ thu được từ quá trình tự thụ phấn của thế hệ M1. Cây sinh trưởng từ hạt thu được từ cây M1 tự thụ phấn là cây M2.

Ví dụ, việc giảm sự biểu hiện có thể được xác định bằng cách xác định lượng bản sao ARN mã hóa protein tương tự xyclin SDS, chẳng hạn bằng cách sử dụng phương pháp phân tích thắm Northern hoặc RT-PCR. Ở đây, tốt hơn là việc giảm có nghĩa là giảm về số lượng bản sao đi ít nhất 50%, đặc biệt là giảm ít nhất 70%, tốt hơn là giảm ít nhất là 85% và đặc biệt tốt hơn là giảm ít nhất 95%.

Sự giảm số lượng protein tương tự xyclin SDS mà dẫn đến hoạt tính của các protein này giảm ở tế bào thực vật hoặc thực vật liên quan, có thể được xác định bằng các phương pháp miễn dịch học như phương pháp phân tích thắm Western, ELISA (thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) hoặc RIA (thử nghiệm miễn dịch phóng xạ - Radio Immune Assay) chẳng hạn. Ở đây, tốt hơn là việc giảm có nghĩa là giảm về lượng protein tương tự xyclin SDS đi ít nhất 50%, đặc biệt là giảm ít nhất 70%, tốt hơn là giảm ít nhất 85% và đặc biệt tốt hơn là giảm ít nhất 95%.

Phương pháp sản xuất kháng thể mà phản ứng đặc hiệu với protein định rõ, nghĩa là gắn kết đặc hiệu với protein đã nêu, là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực (chẳng hạn xem tài liệu Lottspeich and Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Việc sản xuất các kháng thể như vậy được đề nghị dưới dạng dịch vụ theo hợp đồng bởi một số hãng.

Liên quan đến sáng chế này, sự giảm hoạt tính của protein tương tự xyclin SDS

ở thực vật theo sáng chế cũng có thể được xác định bởi kiểu hình thực vật. Thực vật đồng hợp tử đối với một alen đột biến mã hóa protein tương tự xyclin SDS hoặc có hoạt tính protein tương tự xyclin SDS giảm, tạo ra quả không hạt và là thực vật hữu thụ được (tạo ra phần hữu thụ).

Theo một phương án, hoạt tính giảm của protein có chức năng tương tự xyclin SDS giảm ở tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế so với tế bào thực vật kiểu đại tương ứng hoặc thực vật kiểu đại.

Trong ngữ cảnh của sáng chế này, thuật ngữ "tế bào thực vật kiểu đại" hoặc "thực vật kiểu đại" có nghĩa là tế bào thực vật hoặc thực vật liên quan được dùng làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế, nghĩa là hình thành bộ gen của chúng, ngoài các cải biến hoặc các đột biến (di truyền) được đưa vào, tương ứng với các cải biến hoặc các đột biến của tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế. Theo một khía cạnh, thực vật kiểu đại hoặc tế bào thực vật kiểu đại là thực vật chứa protein tương tự xyclin SDS chức năng đầy đủ, chẳng hạn đối với thực vật hoặc tế bào thực vật của dưa hấu, cây dưa hấu lưỡng bội sản sinh protein có SEQ ID NO 2 và tạo ra quả có hạt nhờ tự thụ phấn. Hoặc đối với cây dưa hoặc tế bào dưa, cây dưa lưỡng bội sản sinh protein có SEQ ID NO 6, hoặc đối với cây dưa chuột hoặc tế bào cây dưa chuột, cây dưa chuột lưỡng bội sản sinh protein có SEQ ID NO 12, hoặc đối với cây cà chua hoặc tế bào cà chua, cây cà chua lưỡng bội sản sinh protein có SEQ ID NO 19, hoặc đối với cây hồ tiêu hoặc tế bào hồ tiêu, cây lưỡng bội sản sinh protein có SEQ ID NO: 20.

Trong sáng chế này, thuật ngữ "tương ứng" có nghĩa là, khi so sánh vài đối tượng, các đối tượng được đề cập đến được so sánh với một đối tượng khác được giữ trong cùng điều kiện. Trong sáng chế này, thuật ngữ "tương ứng" liên quan đến tế bào thực vật kiểu đại hoặc thực vật kiểu đại có nghĩa là tế bào thực vật hoặc thực vật, được so sánh với một tế bào thực vật hoặc thực vật khác, mà được tạo ra trong cùng điều kiện nuôi cấy, mà chúng có cùng tuổi (nuôi cấy) và sự hình thành bộ gen của chúng, ngoài các cải biến hoặc các đột biến (di truyền) được đưa vào, tương ứng với các cải biến và đột biến của thực vật hoặc tế bào thực vật theo sáng chế. Trong trường hợp trình tự axit nucleic của các phân tử ARN và ADN được so sánh với nhau hoặc tương

ứng với nhau, đã biết rõ rằng thymin (T) trong phân tử ADN tương đương với uridin (U) trong phân tử ARN. Vì vậy, T trong trình tự ADN được hiểu là được thay thế bởi U trong trình tự ARN và *ngược lại*, khi các phân tử này được so sánh với nhau.

Tốt hơn là trong các phương án theo sáng chế, protein tương tự xyclin SDS của tế bào thực vật kiểu đại, phân thực vật hoặc thực vật kiểu đại được mã hóa bởi các phân tử axit nucleic được chọn từ nhóm gồm:

- a) các phân tử axit nucleic, mã hóa protein với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO 2 (protein tương tự xyclin SDS ở dưa hấu) hoặc SEQ ID NO 6 (protein tương tự xyclin SDS ở dưa) hoặc SEQ ID NO 12 (protein tương tự xyclin SDS ở dưa chuột) hoặc SEQ ID NO: 19 (protein tương tự xyclin SDS ở *Solanum lycopersicum*) hoặc SEQ ID NO: 20 (protein tương tự xyclin SDS ở *Capsicum annuum*);
- b) các phân tử axit nucleic mã hóa protein, trình tự của nó có mức đồng nhất ít nhất là 58% hoặc ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90%, hoặc đặc biệt tốt hơn là ít nhất 95% với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO 2 hoặc SEQ ID NO 6 hoặc SEQ ID NO 12 hoặc SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20;
- c) các phân tử axit nucleic, bao gồm trình tự nucleotit như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 hoặc SEQ ID NO 5 hoặc SEQ ID NO 17 hoặc trình tự bổ trợ của nó;
- d) các phân tử axit nucleic, mà có mức đồng nhất ít nhất 58% hoặc ít nhất 60% tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90% hoặc đặc biệt tốt hơn là ít nhất 95% với trình tự nucleotit được mô tả ở phần c) dưới đây;
- e) các phân tử axit nucleic, mà lai với ít nhất một mạch của các phân tử axit nucleic được mô tả trong các điều kiện nghiêm ngặt a), b), c), hoặc d);
- f) các phân tử axit nucleic, trình tự nucleotit mà dẫn xuất từ trình tự của các phân tử axit nucleic được nhận biết trong các điều kiện a), b), c) hoặc d) do sự suy biến của mã di truyền; và
- g) các phân tử axit nucleic, mà là các mảnh, biến thể alen và/hoặc các dẫn

xuất của các phân tử axit nucleic được nhận biết trong các điều kiện a), b), c) hoặc d).

Trình tự nucleotit bộ gen như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1, và trình tự mã hóa như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1, mã hóa protein tương tự xyclin SDS kiểu đại của *Citrullus lanatus* (dưa hấu) có trình tự axit amin như được chỉ ra trong SEQ ID NO 2. SEQ ID NO 5 là trình tự mã hóa ghi mã protein tương tự xyclin SDS kiểu đại từ *Cucumis melo* (dưa) có trình tự axit amin như được chỉ ra trong SEQ ID NO 6. SEQ ID NO 12 là protein tương tự xyclin SDS kiểu đại từ *Cucumis sativus* (dưa chuột). SEQ ID NO: 19 là protein tương tự xyclin SDS kiểu đại của *Solanum lycopersicum* (cà chua). SEQ ID NO: 20 là protein tương tự xyclin SDS kiểu đại của *Capsicum annuum* (hồ tiêu).

Tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật theo sáng chế có thể là tế bào thực vật từ loài bất kỳ hoặc thực vật thuộc loài bất kỳ. Tế bào thực vật theo sáng chế có thể là tế bào thực vật một lá mầm và hai lá mầm, thực vật theo sáng chế có thể là thực vật một lá mầm và hai lá mầm. Tốt hơn là tế bào thực vật theo sáng chế là tế bào thực vật của rau (tế bào cây rau) hoặc thực vật là cây rau, đặc biệt là rau như cà chua, hành, tỏi tây, tỏi, cà rốt, hồ tiêu, măng tây, ác-ti-sô, cần tây, dưa chuột, dưa, bầu, bí, rau diếp, dưa hấu, rau bi-na, cải bắp (*Brassica oleracea*), rau mát, cà tím và đậu bắp. Tốt hơn nữa là tế bào thực vật từ rau (tế bào cây rau) hoặc cây rau từ họ *Cucurbitaceae* hoặc họ *Solanaceae*. Tốt nhất là tế bào thực vật và thực vật theo sáng chế bao gồm bí (*Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Lagenaria siceraria*), dưa (*Cucumis melo*), dưa chuột (*Cucumis sativus*), dưa hấu (*Citrullus lanatus*), cà chua (*Solanum lycopersicum*) hoặc hồ tiêu (*Capsicum annuum*) tế bào thực vật hoặc thực vật, đặc biệt tốt hơn là tế bào thực vật từ dưa hấu (*Citrullus lanatus*) hoặc dưa (*Cucumis melo*) hoặc cây dưa hấu (*Citrullus lanatus*) hoặc cây dưa (*Cucumis melo*). Theo một phương án, thực vật và tế bào thực vật là thực vật được gieo trồng thuộc các loài này, như các dòng lai gần hoặc các giống có các đặc tính nông học tốt, đặc biệt là tạo ra các sản phẩm có thể tiêu thụ được trên thị trường (chẳng hạn quả) có chất lượng tốt và độ đồng đều.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến thực vật và các phần của thực

vật chứa tế bào thực vật theo sáng chế.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến thực vật hoặc tế bào thực vật, đặc trưng ở chỗ tế bào thực vật hoặc thực vật này có hoạt tính protein tương tự xyclin SDS giảm so với tế bào thực vật kiểu dại hoặc thực vật kiểu dại tương đương, trong đó protein tương tự xyclin SDS của tế bào thực vật kiểu dại hoặc thực vật kiểu dại tương đương được mã hóa bởi các phân tử axit nucleic được chọn từ nhóm gồm

- a) các phân tử axit nucleic, mã hóa protein với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO 2 (protein tương tự xyclin SDS ở dưa hấu) hoặc SEQ ID NO 6 (protein tương tự xyclin SDS ở dưa) hoặc SEQ ID NO 12 (protein tương tự xyclin SDS ở dưa chuột) hoặc SEQ ID NO: 19 (protein tương tự xyclin SDS ở *Solanum lycopersicum*) hoặc SEQ ID NO: 20 (protein tương tự xyclin SDS ở *Capsicum annuum*);
- b) Các phân tử axit nucleic mã hóa protein, trình tự của nó có mức đồng nhất ít nhất là 58% hoặc ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90% hoặc đặc biệt tốt hơn là ít nhất 95% với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO 2 hoặc SEQ ID NO 6 hoặc SEQ ID NO 12 hoặc SEQ ID NO 19 hoặc SEQ ID NO 20;
- c) Các phân tử axit nucleic, bao gồm trình tự nucleotit như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 hoặc SEQ ID NO 5 hoặc SEQ ID NO 17 hoặc trình tự bổ trợ của nó;
- d) Các phân tử axit nucleic, mà có mức đồng nhất ít nhất 58% hoặc ít nhất 60% tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90% hoặc đặc biệt tốt hơn là ít nhất 95% với trình tự nucleotit được mô tả ở phần c) dưới đây;
- e) Các phân tử axit nucleic, mà lai với ít nhất một mạch của các phân tử axit nucleic được mô tả ở a), b), c), hoặc d) trong các điều kiện nghiêm ngặt;
- f) Các phân tử axit nucleic mà trình tự nucleotit của nó khác với trình tự của các phân tử axit nucleic được nhận biết ở a), b), c) hoặc d) do sự suy biến của mã di truyền; và
- g) Các phân tử axit nucleic, mà là các mảnh, biến thể alen và/hoặc các dẫn

xuất của các phân tử axit nucleic được nhận biết trong các điều kiện a), b), c) hoặc d).

“Mức đồng nhất về trình tự” và “mức giống nhau về trình tự” có thể được xác định bằng cách sắp thẳng hàng hai peptit hoặc hai trình tự nucleotit bằng cách sử dụng các thuật toán sắp thẳng hàng địa phương hoặc toàn cầu. Tiếp theo, các trình tự có thể được đề cập đến như là “về cơ bản đồng nhất” hoặc “tính đồng nhất đáng kể” khi chúng được sắp thẳng hàng một cách tối ưu chẳng hạn bởi các chương trình GAP hoặc BESTFIT hoặc chương trình Emboss “Needle” (bằng cách sử dụng các thông số mặc định, xem dưới đây) có chung ít nhất một tỷ lệ phần trăm tối thiểu nhất định về mức đồng nhất trình tự (như được xác định kỹ hơn dưới đây). Các chương trình này sử dụng thuật toán sắp thẳng hàng toàn cầu Needleman và Wunsch để sắp thẳng hàng hai trình tự, trên toàn bộ chiều dài của chúng, tối ưu hóa số cặp và tối ưu hóa số khoảng trống. Nhìn chung, các thông số mặc định được sử dụng, với điểm phạt tạo khoảng trống = 10 và điểm phạt kéo dài khoảng trống = 0,5 (đối với việc sắp thẳng hàng của cả nucleotit và protein). Đối với nucleotit, ma trận cho điểm mặc định được sử dụng là ADNFULL và đối với protein ma trận cho điểm mặc định là Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 10915-10919). Sự sắp thẳng hàng trình tự và điểm về mức đồng nhất trình tự theo tỷ lệ phần trăm có thể được xác định chẳng hạn bằng cách sử dụng các chương trình máy tính, như EMBOSS, có thể truy cập tại trang web toàn cầu [ebi.ac.uk/Tools/emboss/](http://ebi.ac.uk/Tools/emboss/). Theo cách khác, sự giống nhau hoặc đồng nhất về mặt trình tự có thể được xác định bằng cách tra cứu dựa vào cơ sở dữ liệu (chẳng hạn EMBL, GenBank) bằng cách sử dụng các thuật toán thông thường đã biết và các định dạng đầu ra như FASTA, BLAST, v.v., nhưng các kết quả cần phải được gọi ra và được sắp thẳng hàng theo từng cặp một để so sánh mức đồng nhất về trình tự. Hai protein hoặc hai miền protein, hoặc hai trình tự axit nucleic có “mức đồng nhất cơ bản về trình tự” nếu mức đồng nhất về trình tự theo tỷ lệ phần trăm ít nhất là 58%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn (như được xác định bằng Emboss “needle” bằng cách sử dụng các thông số mặc định, nghĩa là điểm phạt tạo khoảng trống = 10, điểm phạt kéo dài khoảng trống = 0,5, bằng cách sử dụng ma trận ghi điểm ADNFULL đối với axit nucleic, Blosum62 đối với protein). Các trình tự như vậy còn

được đề cập đến như là “biến thể” hoặc “biến thể alen” hoặc “dẫn xuất” trong bản mô tả này. Các biến thể alen khác của các gen/alen mã hóa protein tương tự xyclin SDS và protein tương tự xyclin SDS ngoài các trình tự axit nucleic và protein cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được nhận biết. Vì vậy, ví dụ protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất cơ bản về trình tự với protein có trình tự SEQ ID NO: 2, hoặc với protein có trình tự SEQ ID NO: 6, hoặc với protein có trình tự SEQ ID NO: 12, hoặc với protein có trình tự SEQ ID NO: 18, hoặc với protein có trình tự SEQ ID NO: 19 là biến thể của protein đã nêu.

Biến thể alen có thể tồn tại trong các tế bào thực vật hoặc thực vật rau được gieo trồng, đặc biệt là rau như các loài cà chua, hành, tỏi tây, tỏi, cà rốt, hồ tiêu, măng tây, ác-ti-sô, bầu, bí, cần tây, dưa chuột, dưa, rau diếp, dưa hấu, rau bi-na, cải bắp (*Brassica*), rau mát và đậu bắp. Sự đột biến ở các biến thể alen như vậy của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có cùng ảnh hưởng đến khả năng sinh sản của cây đực và cây cái và sự tạo quả không hạt ở các thực vật rau khác. Biến thể alen cụ thể của gen tương tự xyclin SDS có thể tồn tại ở tế bào thực vật hoặc thực vật từ họ *Cucurbitaceae*, như dưa (*Cucumis melo*), dưa chuột (*Cucumis sativus*), dưa hấu (*Citrullus lanatus*), bí (*Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Lagenaria siceraria*), biến thể alen được đặc biệt ưu tiên của gen tương tự xyclin SDS có thể tồn tại ở tế bào thực vật của dưa hấu (*Citrullus lanatus*), dưa (*Cucumis melo*) hoặc dưa chuột (*Cucumis sativus*) hoặc thực vật dưa hấu (*Citrullus lanatus*) hoặc dưa (*Cucumis melo*) hoặc dưa chuột (*Cucumis sativus*). Ngoài ra, biến thể alen của gen tương tự xyclin SDS cũng có thể tồn tại ở tế bào thực vật hoặc thực vật từ họ *Solanaceae*, như cà chua (*Solanum lycopersicum*) hoặc các họ đại của cà chua (*S. pimpinelli*, *S. cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. pimpinellifolium*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. neorickii*, và *S. pennelli*, *S. arcanum*, *S. chilense*, *S. corneliomulleri*, *S. huaylasense*, và *S. peruvianum*), hồ tiêu (*Capsicum annuum*), *Solanum melongena* (cà tím), *Solanum tuberosum* (khoai tây), v.v..

Biến thể alen cũng có thể tồn tại ở các cây trồng được gieo trồng khác, như các cây trồng trên đồng ruộng (chẳng hạn các loài *Brassica*, ngô, lúa, đậu tương, lúa mì, lúa mạch, bông, thuốc lá, cà phê, v.v.) hoặc các cây ăn quả (chẳng hạn nho, táo, mận,

quả có mùi, dâu tây, v.v.).

Lưu ý rằng protein tương tự xyclin SDS của Cucurbitaceae có mức đồng nhất về trình tự cao với nhau (ít nhất 70% đối với trình tự đưa ra) và protein tương tự xyclin SDS của Solanaceae cũng có mức đồng nhất về trình tự cao với nhau. Mặt khác, mức đồng nhất về trình tự giữa các trình tự Cucurbitaceae và Solanaceae là không cao (40% hoặc thấp hơn), xem bảng A dưới đây.

Bảng A – mức đồng nhất về trình tự của protein tương tự xyclin SDS (sắp thẳng hàng các cặp đôi bằng cách sử dụng Needleman và Wunsch)

|                                | Dưa hấu<br>(SEQ ID<br>NO 2) | Dưa (SEQ<br>ID NO 6) | Dưa chuột<br>(SEQ ID<br>NO 12) | Cà chua<br>(SEQ ID<br>NO 19) | Hồ tiêu<br>(SEQ ID<br>NO 20) |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Dưa hấu<br>(SEQ ID<br>NO 2)    | 100%                        | 73%                  | 70%                            | 34%                          | 32%                          |
| Dưa (SEQ<br>ID NO 6)           |                             | 100%                 | 86%                            | 40%                          | 38%                          |
| Dưa chuột<br>(SEQ ID<br>NO 12) |                             |                      | 100%                           | 40%                          | 37%                          |
| Cà chua<br>(SEQ ID<br>NO 19)   |                             |                      |                                | 100%                         | 81%                          |
| Hồ tiêu<br>(SEQ ID<br>NO 20)   |                             |                      |                                |                              | 100%                         |

“Các điều kiện lai nghiêm ngặt” có thể được sử dụng để nhận biết các trình tự nucleotit, mà về cơ bản đồng nhất với trình tự nucleotit đã nêu. Các điều kiện nghiêm ngặt phụ thuộc trình tự và khác nhau trong các trường hợp khác nhau. Thông thường, các điều kiện nghiêm ngặt được chọn thấp hơn khoảng 5°C so với điểm nhiệt nóng chảy (T<sub>m</sub>) đối với các trình tự cụ thể ở nồng độ ion và độ pH xác định. T<sub>m</sub> là nhiệt độ (ở nồng độ ion và độ pH xác định) mà ở đó 50% trình tự đích lai hóa với một đoạn dò được ghép đôi một cách hoàn toàn. Thông thường, các điều kiện nghiêm ngặt sẽ được chọn trong đó nồng độ muối bằng khoảng 0,02 phân tử gam ở độ pH 7 và nhiệt độ ít nhất là 60°C. Việc giảm nồng độ muối và/hoặc tăng nhiệt độ làm tăng tính nghiêm ngặt. Các điều kiện nghiêm ngặt để lai hóa ARN-ADN (thậm Northern bằng cách sử

dụng đoạn dò chẳng hạn 100nt) là các điều kiện bao gồm ít nhất một lần rửa trong 0,2X SSC ở 63°C trong 20 phút chẳng hạn, hoặc các điều kiện tương đương. Các điều kiện nghiêm ngặt để lai hóa ADN-ADN (thăm Southern bằng cách sử dụng đoạn dò chẳng hạn 100nt) là các điều kiện trong đó bao gồm ít nhất một lần rửa (thường là hai lần) trong 0,2X SSC ở nhiệt độ ít nhất 50°C, thường là khoảng 55°C, trong 20 phút chẳng hạn, hoặc các điều kiện tương đương. Cũng xem tài liệu Sambrook et al. (1989) và Sambrook và Russell (2001).

Sự giảm hoạt tính của protein tương tự xylin SDS trong tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế cũng có thể đạt được bằng tác dụng gây câm gen.

Theo một phương án khác của sáng chế, hoạt tính giảm của protein tương tự xylin SDS ở tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế là do tác dụng gây câm gen.

Tế bào thực vật theo sáng chế và thực vật theo sáng chế có hoạt tính protein tương tự xylin SDS giảm có thể được sản xuất bằng các phương pháp khác nhau dẫn đến tác dụng gây câm gen đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ, sự biểu hiện của ARN đối nghĩa tương ứng hoặc của cấu trúc ARN sợi kép (công nghệ ARNi), sự cung cấp các phân tử axit nucleic hoặc các vector, mà có tác dụng đồng kìm hãm sự biểu hiện của ribozym được tạo cấu trúc tương ứng mà phân tách các sản phẩm phiên mã cụ thể mã hóa protein tương tự xylin SDS.

Sự giảm hoạt tính protein tương tự xylin SDS ở tế bào thực vật và thực vật theo sáng chế có thể được gây ra bởi việc biểu hiện trình tự đối nghĩa ở các tế bào thực vật hoặc thực vật tương ứng.

Sự giảm hoạt tính protein tương tự xylin SDS ở tế bào thực vật và thực vật theo sáng chế có thể có được bằng cách biểu hiện đồng thời các phân tử ARN có nghĩa và đối nghĩa (công nghệ ARN can thiệp -ARNi) của gen đích tương ứng cần ức chế, tốt hơn là của gen hoặc alen mã hóa protein tương tự xylin SDS.

Ngoài ra, đã biết rằng ở thực vật, sự hình thành các phân tử ARN sợi kép của trình tự khởi đầu có thể dẫn đến *in trans* để methyl hóa và sự bất hoạt quá trình phiên mã của các bản sao tương đồng của trình tự khởi đầu này (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). Sự giảm hoạt tính protein tương tự xylin SDS ở tế bào thực vật

và thực vật theo sáng chế có thể có được nhờ sự biểu hiện đồng thời của các phân tử ARN có nghĩa và đối nghĩa (công nghệ ARNi) của trình tự khởi đầu khởi đầu sự phiên mã của gen đích tương ứng cần ức chế, tốt hơn là của gen hoặc alen mã hóa protein tương tự xyclin SDS.

Các ribozym cũng đã được mô tả trước đây để làm giảm sự biểu hiện của protein bằng cách phân cắt các phân tử ARN mã hóa gen đích này.

Thảo luận khác về các kỹ thuật gây câm gen tương ứng đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực sẽ được đưa ra tiếp theo dưới đây và có khả năng áp dụng cho tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế.

“Tác dụng gây câm gen” dùng để chỉ điều tiết giảm hoặc sự ức chế hoàn toàn sự biểu hiện gen của gen hoặc họ gen đích. Các tế bào thực vật hoặc thực vật đã được gây câm tạo ra lượng sản phẩm phiên mã có thể dịch mã (bao gồm mRNA) ít hơn đối với gen đích hoặc alen tương ứng, so với tế bào thực vật kiểu đại tương ứng hoặc thực vật kiểu đại tương ứng. Lượng sản phẩm phiên mã có thể dịch mã (bao gồm mRNA) ít hơn có thể là do sự phân hủy đích của các sản phẩm phiên mã tương ứng.

“Gen hoặc alen đích” có thể được hiểu là gen hoặc alen hoặc họ gen (hoặc một hoặc nhiều alen cụ thể của gen này) mà nó cần phải được điều biến để sinh vật (chẳng hạn tế bào thực vật hoặc thực vật) tạo ra được kiểu hình mong muốn. Liên quan đến thực vật tạo ra quả không hạt bất thụ được chẳng hạn (a) (các) gen đích hoặc (a) (các) alen đích là (các) gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS.

Theo một phương án khác của sáng chế, hoạt tính giảm của protein tương tự xyclin SDS ở tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế được gây ra bởi phương pháp điều biến miễn dịch.

Một phương pháp có thể có khác để làm giảm hoạt tính enzyme của protein ở tế bào thực vật hoặc thực vật còn được gọi là phương pháp điều biến miễn dịch. Đã biết rằng sự biểu hiện của các kháng thể *in planta*, mà nhận biết một cách cụ thể protein thực vật, dẫn đến sự giảm hoạt tính của protein đã nêu. Thảo luận tiếp theo về công nghệ tương ứng đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực sẽ được đưa ra tiếp theo dưới đây.

Một phương án khác nữa của sáng chế là tế bào thực vật hoặc thực vật đặc trưng ở chỗ chúng chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có thể có mặt ở dạng đồng hợp tử hoặc dị hợp tử. Theo một khía cạnh, thể đột biến alen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có chức năng protein đột biến đã được mã hóa giảm hoặc mất chức năng protein đột biến đã được mã hóa. Thể đột biến alen có thể mã hóa protein với một hoặc nhiều axit amin được thay thế, cài xen hoặc khuyết đoạn, tạo ra protein có chức năng giảm hoặc mất chức năng so với protein (chức năng) kiểu dại. Theo một khía cạnh, thể đột biến alen tạo ra protein tương tự xyclin SDS được tạo ra, protein bị cắt cụt này có chức năng giảm hoặc mất chức năng. Theo một khía cạnh khác, thể đột biến alen mã hóa protein với một hoặc nhiều axit amin được thay thế, cài xen hoặc khuyết đoạn trong một miền bảo toàn của protein tương tự xyclin SDS, như miền xyclin\_N (pfam00134) hoặc miền xyclin\_C (pfam02984). Miền xyclin\_N và miền xyclin\_C của protein có thể được nhận biết bởi chuyên gia chẳng hạn bởi protein dựa trên protein BLAST trên trang web của NCBI (trang web toàn cầu ở [blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)) hoặc bằng cách tra cứu trong cơ sở dữ liệu miền bảo toàn của NCBI (trang web toàn cầu ở [ncbi.nlm.nih.gov/cdd](http://ncbi.nlm.nih.gov/cdd)).

Trong trình tự SEQ ID NO: 2, miền xyclin\_N nằm trong khoảng từ axit amin 388 đến axit amin 463 và miền xyclin\_C nằm trong khoảng từ axit amin 466 đến 531.

Protein đối với protein BLAST tạo ra các miền Cyclin\_N và Cyclin\_C của câu lệnh tra cứu được sử dụng, bao gồm sắp thẳng hàng trình tự nghi ngờ với miền này. Lưu ý rằng “từ” một số nhất định “đến” một số khác bao gồm các điểm cuối, nghĩa là bao gồm số đầu tiên và số cuối cùng đã nêu. Vì vậy, đối với trình tự protein bất kỳ được nêu ở đây, hoặc đối với các trình tự biến thể khác (chẳng hạn các protein có mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95% hoặc lớn đối với trình tự protein bất kỳ được nêu ở đây, chẳng hạn SEQ ID NO: 2, 6, 12, 19 hoặc 20), các miền xyclin\_N và xyclin\_C có thể được xác định.

Trong SEQ ID NO 6, miền xyclin\_N nằm trong khoảng từ axit amin 351 đến axit amin 481 và miền xyclin\_C nằm trong khoảng từ axit amin 486 đến axit amin 577.

Trong SEQ ID NO: 12, miền xylin\_N nằm trong khoảng từ axit amin 343 đến axit amin 473 và miền xylin\_C nằm trong khoảng từ axit amin 478 đến axit amin 569.

Trong SEQ ID NO: 19, miền xylin\_N nằm trong khoảng từ axit amin 362 đến axit amin 494 và miền xylin\_C nằm trong khoảng từ axit amin 499 đến 584.

Trong SEQ ID NO: 20, miền xylin\_N nằm trong khoảng từ axit amin 332 đến axit amin 464 và miền xylin\_C nằm trong khoảng từ axit amin 469 đến 554.

Thực vật trong đó thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS có mặt ở trạng thái dị hợp tử, sẽ tạo ra hạt và là thực vật hữu thụ được. Vì vậy, các thực vật đó có thể được sử dụng để đưa thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS vào một thực vật khác hoặc chúng có thể được sử dụng để đưa các tính trạng khác vào thực vật trong đó thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS có mặt. Các thực vật này cũng có thể được sử dụng để nhân giống thực vật chứa alen đột biến của gen mã hóa tương tự xylin SDS. 50% cây con được tự thụ phấn trong mỗi trường hợp cũng sẽ mang thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS ở trạng thái dị hợp tử. Vì vậy, thực vật trong đó thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS có mặt là hữu hiệu trong nhân giống chẳng hạn.

Vì vậy, một phương án của sáng chế đề cập đến tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế mà dị hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, hoạt tính giảm của protein tương tự xylin SDS ở tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế là do hoặc được gây ra bởi hoặc là tác dụng của alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS có mặt trong tế bào thực vật hoặc thực vật, tương ứng.

Theo một khía cạnh, tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế đồng hợp tử đối với thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS mã hóa protein tương tự xylin SDS có chức năng giảm hoặc protein tương tự xylin SDS mất chức năng. Thực vật theo sáng chế đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa

protein tương tự xyclin SDS tạo ra quả không hạt nhờ vào sự thụ phấn với phần của nó hoặc phần thu được từ một thực vật khác (chẳng hạn từ thực vật kiểu đại).

Vì vậy, một phương án khác của sáng chế đề cập đến tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS.

Alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS tạo ra thực vật hữu thụ được nhưng tạo ra quả không hạt, khi thực vật này là đồng hợp tử đối với alen đột biến này. Đối với các phương án của sáng chế, sự đột biến ở thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có thể là đột biến bất kỳ, bao gồm xóa đoạn, cắt cụt, cài xen, đột biến điểm, đột biến đối nghĩa, đột biến vô nghĩa hoặc không cùng nghĩa, đột biến ở vị trí cắt, đột biến dịch chuyển khung và/hoặc đột biến trong các trình tự điều tiết. Tốt hơn là, đột biến trong thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS là đột biến điểm và/hoặc đột biến ở vị trí cắt. Đột biến này có thể xảy ra trong trình tự ADN bao gồm trình tự mã hóa của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hoặc trong Trình tự ARN mã hóa protein tương tự xyclin SDS hoặc nó có thể xảy ra trong axit amin của protein tương tự xyclin SDS. Đối với trình tự ADN của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, đột biến này có thể xảy ra trong trình tự mã hóa (cds, bao gồm các exon) hoặc nó có thể xảy ra trong các trình tự không mã hóa như các vùng không dịch mã 5' và 3', các intron, các trình tự khởi đầu, các trình tự tăng cường, v.v. của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Đối với ARN mã hóa protein tương tự xyclin SDS, đột biến này có thể xảy ra trong tiền-mARN hoặc mARN. Theo một khía cạnh, thể đột biến alen tạo ra protein mất chức năng hoặc có chức năng giảm do một hoặc nhiều axit amin bị thay thế, cài xen và/hoặc xóa đoạn, ví dụ dẫn đến một hoặc nhiều axit amin bị thay thế, cài xen hoặc xóa đoạn trong miền xyclin\_N và/hoặc miền xyclin\_C bảo toàn. Ví dụ, sự cắt cụt protein để tạo ra sự xóa đoạn của miền xyclin\_C, hoặc một phần của nó, hoặc miền xyclin\_N và miền xyclin\_C hoặc một phần của miền xyclin\_N và miền xyclin\_C sẽ dẫn đến sự mất chức năng hoặc giảm chức năng của protein này.

Vì vậy, một phương án khác nữa của sáng chế đề cập đến tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS

đặc trưng ở chỗ alen đột biến này bao gồm hoặc tác động đến một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm gồm:

- a) đột biến xóa đoạn, cắt cụt, cài xen, đột biến điểm, đột biến vô nghĩa, đột biến sai nghĩa hoặc đột biến không cùng nghĩa, đột biến ở vị trí cắt, đột biến dịch chuyển khung trong trình tự bộ gen;
- b) đột biến ở một hoặc nhiều trình tự điều tiết;
- c) đột biến xóa đoạn, cắt cụt, cài xen, đột biến điểm, đột biến vô nghĩa, sai nghĩa hoặc đột biến không cùng nghĩa, đột biến ở vị trí cắt, đột biến dịch chuyển khung trong trình tự mã hóa;
- d) đột biến xóa đoạn, cắt cụt, cài xen, đột biến điểm, đột biến vô nghĩa, sai nghĩa hoặc đột biến không cùng nghĩa, đột biến ở vị trí cắt, đột biến dịch chuyển khung trong tiền-mARN hoặc mARN; và/hoặc
- e) sự xóa đoạn, cắt cụt, cài xen hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin trong protein tương tự cyclin SDS.

So với SEQ ID NO 1, một trong số các alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự cyclin SDS được bộc lộ ở đây theo một phương án (có mặt trong cây dựa hấu EMB1 đột biến), có đột biến điểm (thay thế G bằng A) ở vị trí nucleotit 2185 trong SEQ ID NO 1. mARN được phiên mã từ alen đột biến đã được bộc lộ của gen mã hóa protein tương tự cyclin SDS là như được chỉ ra trong SEQ ID NO 3. Nucleotit tương ứng ở vị trí 2186 đến 2201 của alen kiểu đại của gen mã hóa protein tương tự cyclin SDS như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 không có mặt trong mARN như được chỉ ra trong SEQ ID NO 3. Vì vậy, đột biến điểm được phát hiện trong alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự cyclin SDS gây ra sự xóa đoạn của 16 nucleotit trong mARN được phiên mã từ thể đột biến alen so với mARN được phiên mã từ alen kiểu đại tương ứng. Sự xóa đoạn trong mARN được phiên mã từ alen đột biến được giải thích bởi sự đột biến của vị trí cắt dẫn đến sự phân cắt lựa chọn của mARN tương ứng. Ngoài ra, sự xóa đoạn của 16 nucleotit trong mARN được phiên mã từ alen đột biến đã nêu của gen mã hóa protein tương tự cyclin SDS gây ra sự dịch chuyển khung trong khung đọc của mARN được phiên mã từ thể đột biến alen so với mARN được phiên mã từ alen kiểu đại tương ứng. Protein được dịch mã từ alen kiểu đại của gen

mã hóa protein tương tự xylin SDS là như được chỉ ra trong SEQ ID NO 2. Protein được dịch mã từ thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS là như được chỉ ra trong SEQ ID NO 4. Trình tự nucleotit tương ứng mã hóa các axit amin từ 358 đến 363 (Ile-Leu-Arg-Phe-Glu-Glu) trong SEQ ID NO 2 không có mặt trong SEQ ID NO 4 và do sự dịch chuyển khung trong khung đọc, phần còn lại của trình tự axit amin là khác nhau và các axit amin 364 đến 562 trong SEQ ID NO 2 được thay bằng 8 axit amin khác thường Asn-Trp-Thr-Met-Lys-Lys-Pro-Ile trong SEQ ID NO 4 (nghĩa là các axit amin từ 358 đến 365 của SEQ ID NO 4). Thể đột biến protein tương tự xylin SDS ngắn hơn nhiều, chỉ có 365 axit amin, so với protein kiểu đại gồm 562 axit amin. Vì vậy, trình tự axit amin của thể đột biến protein tương tự xylin SDS là như được chỉ ra trong SEQ ID NO 4 bao gồm sự xóa đoạn axit amin và sự thay thế axit amin so với protein tương tự xylin SDS kiểu đại như được chỉ ra trong SEQ ID NO 2. Ngoài ra, sự dịch chuyển khung trong khung đọc của mARN được phiên mã từ thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự SDS gây ra sự đột biến vô nghĩa tạo ra codon kết thúc sớm (nucleotit 1096 đến 1098 trong SEQ ID NO 3), dẫn đến trình tự axit amin được mã hóa bởi thể đột biến alen bị cắt cụt 197 axit amin ở đầu tận cùng C so với trình tự axit amin tương ứng được mã hóa bởi alen kiểu đại như được chỉ ra trong SEQ ID NO 2. Vì vậy, so với protein kiểu đại, 205 axit amin của kiểu đại ở đầu tận cùng C được thay bằng 8 axit amin khác (khác thường) ở đầu tận cùng C do sự dịch chuyển khung, tạo ra protein đột biến ngắn hơn 197 axit amin so với protein kiểu đại. Vì vậy, thể đột biến protein được cắt cụt so với protein kiểu đại, do 205 axit amin của kiểu đại ở đầu tận cùng C bị mất trong thể đột biến protein. Chỉ có các axit amin của exon 1 của protein kiểu đại (các axit amin từ 1 đến 357 của SEQ ID NO: 2) cũng có mặt trong thể đột biến protein. Điều này có nghĩa là các miền protein được bảo toàn xylin\_N và xylin\_C cũng không có mặt, có nghĩa là thể đột biến protein không có chức năng (nghĩa là thể đột biến alen là alen mất chức năng) hoặc có chức năng giảm.

Tóm lại, theo một khía cạnh ví dụ được bộc lộ cụ thể trong bản mô tả này là trình tự axit nucleic của alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS có một đột biến điểm (thay thế nucleotit) so với trình tự axit nucleic của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS kiểu đại tương ứng. Đột biến điểm trong thể đột biến alen

của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS gây ra đột biến ở vị trí cắt dẫn đến sự cắt nối thay thế của tiền-mARN tương ứng. Sự cắt nối thay thế gây ra sự dịch chuyển khung trong khung đọc mở của mARN được phiên mã từ thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Sự dịch chuyển khung trong khung đọc mở của mARN được phiên mã từ thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS gây ra sự xóa đoạn của các nucleotit, sự thay thế của các nucleotit (đột biến vô nghĩa hoặc không cùng nghĩa) và sự tạo ra các đột biến vô nghĩa tạo ra codon kết thúc sớm trong mARN được phiên mã từ thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS so với mARN được phiên mã từ gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS kiểu đại tương ứng. Trình tự axit amin tương ứng của protein được dịch mã từ mARN được phiên mã từ thể đột biến gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS thể hiện sự xóa đoạn của các axit amin, sự thay thế của các axit amin và sự cắt cụt của các trình tự axit amin ở đầu tận cùng C so với trình tự axit amin được dịch mã từ mARN được phiên mã từ gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS kiểu đại tương ứng. Do đột biến điểm là ở intron đầu tiên, các axit amin được mã hóa bởi exon 2, exon 3 và exon 4 của protein tương tự xyclin SDS kiểu đại này là bị mất trong thể đột biến, nghĩa là chỉ có các axit amin được mã hóa bởi exon 1 của protein tương tự SDS kiểu đại là có mặt trong thể đột biến protein.

Ở dưa hấu, exon 1 của protein tương tự xyclin SDS mã hóa axit amin 1 đến 357 của SEQ ID NO 2; ở dưa, exon 1 của protein tương tự xyclin SDS mã hóa axit amin 1 đến 338 trong SEQ ID NO: 6; ở dưa chuột, exon 1 của protein tương tự xyclin SDS mã hóa axit amin từ 1 đến 330 trong SEQ ID NO: 12; ở cà chua, exon 1 của protein tương tự xyclin SDS mã hóa axit amin từ 1 đến 350 trong SEQ ID NO 19; ở hồ tiêu, exon 1 của protein tương tự xyclin SDS mã hóa axit amin từ 1 đến 320 trong SEQ ID NO 20.

Ngoài ra, cây dưa hấu đột biến EMB1 được mô tả trên đây (và trong phần ví dụ), một cây dưa hấu khác, chứa một đột biến khác ở gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, đã được tạo ra bằng cách sinh đột biến. Thể đột biến này bao gồm sự thay thế nucleotit C (Xytosin) thành T (Thymin) ở nucleotit 1687 của SEQ ID NO: 1, dẫn đến codon 'cag' (mã hóa axit amin glutamin, axit amin 224 của protein kiểu đại) bị

thay đổi thành ‘tag’, mà là codon kết thúc. Thể đột biến cADN được chỉ ra trong SEQ ID NO 17 và protein bị cắt cụt, chỉ bao gồm một phần của các axit amin được mã hóa bởi exon 1 (nghĩa là chỉ các axit amin từ 1 đến 223 thay vì các axit amin từ 1 đến 357), được chỉ ra trong SEQ ID NO 18. Tương tự, ở cây đột biến EMB1, hai miền bảo toàn, các miền xyclin\_N và xyclin\_C, đều bị mất trong thể đột biến protein. Ngoài ra, thể đột biến này dẫn đến sự mất chức năng (hoặc ít nhất là sự giảm chức năng) của protein tương tự xyclin SDS.

Theo một khía cạnh của sáng chế, thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có đột biến dẫn đến một hoặc nhiều hoặc tất cả các axit amin mã hóa miền xyclin\_N và/hoặc xyclin\_C bị xóa đoạn hoặc bị thay thế bằng các axit amin khác so với kiểu dại. Theo một khía cạnh, thể đột biến alen dẫn đến protein bị cắt cụt không có toàn bộ hoặc một phần của xyclin\_N và/hoặc toàn bộ hoặc một phần của miền xyclin\_C. Ví dụ, thể đột biến alen chứa đột biến dẫn đến codon kết thúc sớm, nhờ đó toàn bộ hoặc một phần của miền xyclin\_N và/hoặc toàn bộ hoặc một phần của miền xyclin\_C không hề có mặt trong protein thu được.

Theo một khía cạnh, thể đột biến alen là alen đột biến của gen tương tự xyclin SDS ở đây hầu có SEQ ID NO: 1 và tạo ra protein có trình tự SEQ ID NO: 4 hoặc protein có trình tự SEQ ID NO: 18.

Theo một khía cạnh của sáng chế, thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có đột biến dẫn đến các axit amin mã hóa các exon 2, 3 và/hoặc 4 của protein kiểu dại vắng mặt. Vì vậy, theo một khía cạnh, thể đột biến alen mã hóa protein cắt cụt tương tự xyclin SDS / hoặc protein chứa sự xóa đoạn, mà không có mặt các axit amin được mã hóa bởi các exon 2, 3 và/hoặc 4 của protein kiểu dại, nghĩa là không có mặt các axit amin từ 358 đến 413 của SEQ ID NO 2 (exon 2) hoặc các axit amin từ 339 đến 394 của SEQ ID NO: 6 (exon 2), các axit amin từ 331 đến 386 của SEQ ID NO 12 (exon 2), các axit amin từ 351 đến 407 của SEQ ID NO 19 (exon 2), các axit amin từ 321 đến 377 của SEQ ID NO: 20 (exon 2), và/hoặc các axit amin từ 414 đến 469 của SEQ ID NO 2 (exon 3) hoặc các axit amin từ 395 đến 493 của SEQ ID NO 6 (exon 3) hoặc các axit amin từ 387 đến 485 của SEQ ID NO 12, các axit amin từ 408 đến 506 của SEQ ID NO 19 (exon 3), các axit amin từ 378 đến 476 của

SEQ ID NO 20 (exon 3), và/hoặc các axit amin từ 470 đến 562 của SEQ ID NO 2 (exon 4) hoặc các axit amin từ 494 đến 577 của SEQ ID NO: 6 (exon 4) hoặc các axit amin từ 486 đến 569 của SEQ ID NO 12 (exon 4), các axit amin từ 507 đến 590 của SEQ ID NO 19 (exon 4), các axit amin 477 đến 560 của SEQ ID NO 20 (exon 4). Tùy ý, thể đột biến alen mã hóa protein tương tự xyclin SDS đã bị cắt cụt / hoặc protein bao gồm sự xóa đoạn, mà nó cũng thiếu toàn bộ hoặc một phần của các axit amin mã hóa exon 1, nghĩa là các axit amin 1 đến 357 của SEQ ID NO 2 hoặc các axit amin 1 đến 338 trong SEQ ID NO: 6 hoặc các axit amin 1 đến 330 trong SEQ ID NO 12 hoặc các axit amin 1 đến 350 của SEQ ID NO 19, hoặc các axit amin 1 đến 320 của SEQ ID NO 20. Đối với các vùng axit amin tương ứng được mã hóa bởi các exon 1, 2, 3 và 4 của protein tương tự xyclin SDS khác, chẳng hạn của các gen tương đồng từ các loài khác, có thể được nhận biết bằng cách sắp thẳng hàng theo cặp ADN bộ gen hoặc các trình tự axit amin. Lưu ý rằng chỉ đối với SEQ ID NO 2, các exon được xác định là các exon thực (được phân tách bởi các intron trong ADN bộ gen), trong khi đối với các trình tự khác, các exon được xác định bằng cách sắp thẳng hàng và có thể không phải là các exon thực, nhưng chúng đúng hơn là các axit amin tương ứng với các exon của SEQ ID NO 2 và vì vậy cũng có thể được đề cập đến một cách đơn giản như là các vùng axit amin của protein.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có, hoặc tạo ra, sự đột biến ở đầu 5' của trình tự mã hóa của nó (mã hóa đầu tận cùng N của protein này). Tốt hơn là, thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có, hoặc tạo ra, đột biến điểm và/hoặc sự cắt cụt ở đầu 5' của trình tự mã hóa của nó. Trước đây đã biết rõ rằng sự đột biến ở condon khởi đầu (ATG) của một gen sẽ có tác dụng là gen tương ứng này không được dịch mã thành protein có chiều dài đầy đủ tương ứng. Để dịch mã, codon khởi đầu có thể có tiếp theo (ATG) có thể được sử dụng, nhưng điều này sẽ dẫn đến sự cắt cụt trình tự axit amin của protein này ở đầu tận cùng N, trong trường hợp ATG tiếp theo xuất hiện trong cùng một khung đọc hoặc dẫn đến sự sản sinh protein có trình tự axit amin khác. Trong cả hai trường hợp, đột biến tương ứng ở đầu 5' sẽ dẫn đến sự sản sinh protein có hoạt tính enzym giảm hoặc mất hoạt tính enzym. Theo một phương án

được ưu tiên của sáng chế, thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có sự đột biến ở codon khởi đầu. Đột biến trong codon khởi đầu này có thể là đột biến điểm ở nucleotit bất kỳ trong số ba nucleotit của nó hoặc đột biến xóa đoạn/cắt cụt của ít nhất nucleotit thứ nhất, ít nhất nucleotit thứ nhất và nucleotit thứ hai hoặc ít nhất cả ba nucleotit thuộc codon khởi đầu này.

Theo các phương án được ưu tiên hơn nữa, sáng chế đề cập đến các alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS mà nó tạo ra sự xóa đoạn ở đầu 3' của trình tự mã hóa của nó (mã hóa đầu tận cùng C của protein này). Khi miền xyclin\_C bảo toàn có mặt ở đầu tận cùng C của protein này, sự cắt cụt dẫn đến một phần của miền xyclin\_C vắng mặt (nghĩa là 1, 2, 3, 4, 5 axit amin hoặc nhiều hơn của miền xyclin\_C hoặc thậm chí toàn bộ miền xyclin\_C) sẽ khiến cho protein này có chức năng giảm hoặc không có chức năng. Sự cắt cụt đoạn dài hơn ở đầu tận cùng C, thậm chí sẽ dẫn đến một phần hoặc toàn bộ miền xyclin\_N bị xóa đoạn, mà nó cũng sẽ dẫn đến protein này có chức năng giảm hoặc không có chức năng. Chỉ có năm axit amin giữa miền xyclin\_C và miền xyclin\_N. Sự cắt cụt khoảng 90 axit amin hoặc nhiều hơn ở đầu tận cùng C dẫn đến hầu hết protein tương tự xyclin SDS mất miền xyclin\_C và sự cắt cụt một đoạn dài hơn gồm 95, 100, 110 axit amin hoặc nhiều hơn sẽ dẫn đến miền xyclin\_N bị xóa đoạn ít nhất một phần. Như đã đề cập đến trước đây, những sự cắt cụt như vậy được bao hàm ở đây, do dẫn đến protein có chức năng giảm hoặc không có chức năng. Như được đề cập đến trước đây, để kiểm tra xem liệu protein này có có chức năng giảm hoặc không có chức năng hay không, cây đột biến đồng hợp tử đối với alen đột biến có thể được kiểm tra kiểu hình đặc trưng để xem liệu kiểu hình mong đợi có xảy ra hay không.

Tốt hơn là alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS dẫn đến sự cắt cụt của ít nhất 10, 20, 30, 40 hoặc 50 nucleotit, tốt hơn là ít nhất 100 nucleotit, tốt hơn nữa là của ít nhất 200 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là của ít nhất 300 nucleotit, tốt hơn nữa là của ít nhất 400 nucleotit và tốt nhất là của ít nhất 500 nucleotit, đặc biệt tốt hơn là của ít nhất 615 nucleotit ở đầu 3' của trình tự mã hóa protein. Sự cắt cụt 591 nucleotit từ một trình tự mã hóa dịch mã thành sự cắt cụt 197 axit amin đối với trình tự protein tương ứng. Ví dụ được ưu tiên đối với protein tương

tự xyclin SDS có sự cắt cụt 197 các axit amin so với trình tự axit amin của protein tương tự xyclin SDS kiểu đại tương ứng (SEQ ID NO 2) là như được chỉ ra trong SEQ ID NO 4. Một ví dụ khác là sự cắt cụt 339 axit amin (nghĩa là 1017 nucleotit của vùng mã hóa) so với protein tương tự SDS kiểu đại tương ứng (SEQ ID NO 2) được chỉ ra trong SEQ ID NO 18.

Theo một phương án, alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có đột biến bất kỳ trong số các đột biến nêu trên trong trình tự axit nucleic mã hóa protein của SEQ ID NO: 2 (dẫn đến protein được mã hóa chứa sự xóa đoạn hoặc sự cắt cụt so với kiểu đại), hoặc trong trình tự axit nucleic bất kỳ mã hóa protein có mức đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95% hoặc nhiều hơn với SEQ ID NO 2, ví dụ như SEQ ID NO 6, có mức đồng nhất về trình tự là 71% với SEQ ID NO 2.

Theo một phương án khác, alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có đột biến bất kỳ trong số các đột biến nêu trên trong trình tự axit nucleic mã hóa protein của SEQ ID NO: 6 (dẫn đến protein được mã hóa chứa sự xóa đoạn hoặc sự cắt cụt so với kiểu đại), hoặc trong trình tự axit nucleic bất kỳ mã hóa protein có mức đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95% hoặc nhiều hơn với SEQ ID NO 6.

Theo một phương án khác, alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có đột biến bất kỳ trong số các đột biến nêu trên trong trình tự axit nucleic mã hóa protein của SEQ ID NO: 12 (dẫn đến protein được mã hóa chứa sự xóa đoạn hoặc sự cắt cụt so với kiểu đại), hoặc trong trình tự axit nucleic bất kỳ mã hóa protein có mức đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95% hoặc lớn hơn với SEQ ID NO: 12.

Theo một phương án khác, alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có đột biến bất kỳ trong số các đột biến nêu trên trong trình tự axit nucleic mã hóa protein của SEQ ID NO: 19 (dẫn đến protein được mã hóa chứa sự xóa đoạn hoặc sự cắt cụt so với kiểu đại), hoặc trong trình tự axit nucleic bất kỳ mã hóa protein có mức đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95% hoặc lớn hơn

đối với SEQ ID NO: 19.

Theo một phương án khác, alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có đột biến bất kỳ trong số các đột biến nêu trên trong trình tự axit nucleic mã hóa protein của SEQ ID NO: 20 (dẫn đến protein được mã hóa chứa sự xóa đoạn hoặc sự cắt cụt so với kiểu dại), hoặc trong trình tự axit nucleic bất kỳ mã hóa protein có mức đồng nhất về trình tự axit amin ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95% hoặc lớn hơn với SEQ ID NO: 20.

Trong một phương án được ưu tiên hơn nữa, alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có đột biến bất kỳ trong số các đột biến nêu trên trong trình tự axit nucleic như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 hoặc trong trình tự có mức đồng nhất ít nhất là 58% hoặc 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90% hoặc đặc biệt tốt hơn là ít nhất 95% với trình tự axit nucleic như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1. Theo một khía cạnh, alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS chứa đột biến trong trình tự axit nucleic như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 hoặc trong trình tự biến thể có mức đồng nhất ít nhất là 58% hoặc 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là 80%; thậm chí tốt hơn nữa là 90% hoặc đặc biệt tốt hơn là 95% với trình tự axit nucleic như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 trong đó nucleotit guanin (G) ở vị trí nucleotit số 2185 trong SEQ ID NO 1 được thay thế bằng adenin (A), xytosin (C) hoặc thymin (T), tốt nhất là nucleotit guanin (G) ở vị trí nucleotit số 2185 trong SEQ ID NO 1, hoặc nucleotit tương đương trong trình tự biến thể, được thay thế bằng adenin (A). Tốt nhất là, alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có trình tự axit nucleotit như được chỉ ra trong SEQ NO 1 chỉ khác là nucleotit guanin (G) ở vị trí nucleotit số 2185 trong SEQ ID NO 1 được thay thế bằng adenin (A), xytosin (C) hoặc thymin (T), đặc biệt tốt nhất là nucleotit guanin (G) ở vị trí nucleotit số 2185 trong SEQ ID NO 1 được thay thế bằng adenin (A). Theo một khía cạnh khác, alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS chứa đột biến trong trình tự axit nucleic như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 hoặc trong trình tự biến thể có mức đồng nhất ít nhất 58% hoặc 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là 80%, thậm chí tốt hơn nữa là 90% hoặc đặc biệt tốt hơn là 95% với trình tự axit nucleic như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1

trong đó trong alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự SDS, nucleotit xytosin (C) ở nucleotit 1687, hoặc nucleotit tương đương trong trình tự biến thể, được thay thế bằng một nucleotit khác, tốt hơn là bằng thymine (T).

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật chứa hoặc tổng hợp mRNA mã hóa protein tương tự xylin SDS, trong đó mRNA mã hóa protein tương tự xylin SDS có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm gồm:

- a) đột biến xóa đoạn
- b) đột biến sai nghĩa hoặc đột biến không cùng nghĩa;
- c) đột biến dịch chuyển khung; và/hoặc
- d) đột biến vô nghĩa.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp mRNA mã hóa protein tương tự xylin SDS có một hoặc nhiều đột biến được chọn từ nhóm gồm:

- a) đột biến xóa đoạn
- b) đột biến sai nghĩa hoặc đột biến không cùng nghĩa;
- c) đột biến dịch chuyển khung; và/hoặc
- d) đột biến vô nghĩa.

Đối với sự xóa đoạn và sự thay thế của một hoặc nhiều nucleotit, tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế tốt hơn là chứa hoặc tổng hợp mRNA mã hóa protein tương tự xylin SDS, trong đó mRNA chứa sự xóa đoạn ít nhất 1, ít nhất 2, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 7, ít nhất 8, ít nhất 10, ít nhất 11, ít nhất 13, ít nhất 14 hoặc tốt hơn là ít nhất 16 nucleotit so với mRNA mã hóa protein tương tự xylin SDS kiểu dại. Theo một khía cạnh, các nucleotit được xóa bỏ trong mRNA là một hoặc nhiều nucleotit của exon 1, exon 2, exon 3 và/hoặc exon 4 của protein tương tự xylin SDS và/hoặc (các) nucleotit bị xóa trong mRNA là một hoặc nhiều nucleotit thuộc miền xylin<sub>N</sub> hoặc xylin<sub>C</sub> của protein tương tự xylin SDS. Theo một khía cạnh, nucleotit là nucleotit của exon 2, chẳng hạn một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các nucleotit bắt đầu từ nucleotit 2186 và kết thúc ở nucleotit 2201 của SEQ ID NO 1.

Tốt hơn là, tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp mARN mã hóa protein tương tự xyclin SDS, đặc trưng ở chỗ mARN này chứa đột biến dịch chuyển khung và/hoặc đột biến vô nghĩa. Đột biến vô nghĩa tạo ra codon kết thúc sớm và vì vậy tạo ra sự cắt cụt của trình tự mã hóa mARN. Theo một phương án ưu tiên, sáng chế đề cập đến tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa mARN mã hóa protein tương tự xyclin SDS, đặc trưng ở chỗ mARN này chứa sự cắt cụt trình tự mã hóa. Sự cắt cụt của trình tự mã hóa mARN của protein tương tự xyclin SDS tốt hơn là sự cắt cụt của ít nhất 100 nucleotit, tốt hơn là của ít nhất 200 nucleotit, tốt hơn nữa là của ít nhất 300 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là của ít nhất 400 nucleotit và cũng tốt hơn nữa là của ít nhất 500 nucleotit, đặc biệt là tốt hơn là của ít nhất 591 nucleotit so với mARN mã hóa protein tương tự xyclin SDS kiểu đại. Theo một khía cạnh, sự cắt cụt của trình tự mã hóa mARN dẫn đến exon 2, 3 và 4 vắng mặt; hoặc exon 3 và 4 vắng mặt; hoặc exon 4 vắng mặt. Theo một khía cạnh khác, sự cắt cụt của trình tự mã hóa mARN dẫn đến toàn bộ hoặc một phần của exon 1, toàn bộ exon 2, toàn bộ exon 3 và toàn bộ exon 4 vắng mặt. Theo một khía cạnh khác, đột biến dịch chuyển khung dẫn đến toàn bộ hoặc một phần của exon 2 thuộc một khung đọc khác. Theo một khía cạnh khác, đột biến dịch chuyển khung dẫn đến toàn bộ hoặc một phần của exon 3 và/hoặc exon 4 thuộc một khung đọc khác. Sự dịch chuyển khung có thể được gây ra bởi sự xóa đoạn của một hoặc nhiều nucleotit (số bất kỳ mà không là bội số của 3, như 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, v.v.), nhờ đó khung đọc bị thay đổi.

Theo một phương án được ưu tiên, tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp mARN mã hóa protein tương tự xyclin SDS mà mARN này có ít nhất 58% hoặc ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90% hoặc đặc biệt tốt hơn là ít nhất 95% mức đồng nhất về trình tự với trình tự mã hóa tương ứng được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 hoặc SEQ ID NO 5 hoặc SEQ ID NO 17 với điều kiện tiên quyết là mARN mã hóa protein tương tự xyclin SDS này bao gồm đột biến vô nghĩa hoặc codon kết thúc sớm. Theo một phương án, codon kết thúc này là thuộc exon 1 của SEQ ID NO: 1, chẳng hạn ở nucleotit từ 1687 đến 1689. Theo một phương án tốt hơn nữa, tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp

mARN mã hóa protein tương tự xylin SDS mà mARN này có mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 58% hoặc 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90% hoặc đặc biệt tốt hơn là ít nhất 95% với trình tự mã hóa được chỉ ra trong SEQ ID NO 3, với điều kiện tiên quyết là nucleotit từ 1096 đến 1098 trong SEQ ID NO 3 là codon kết thúc. Theo một phương án tốt nhất của sáng chế, tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp mARN mã hóa protein tương tự xylin SDS mà mARN này có trình tự như được chỉ ra trong SEQ ID NO 3.

Theo một phương án khác của sáng chế, tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp mARN mã hóa protein tương tự xylin SDS có một hoặc nhiều đột biến, trong đó mARN này được phiên mã từ alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS. Được bao hàm bởi các phương án này của sáng chế là tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp mARN được phiên mã từ alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS, đặc trưng ở chỗ mARN này bao gồm đột biến xóa đoạn và/hoặc đột biến sai nghĩa hoặc đột biến không cùng nghĩa và/hoặc đột biến dịch chuyển khung và/hoặc đột biến vô nghĩa, so với trình tự mã hóa (ADN) tương ứng của alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS mà từ đó mARN này được phiên mã. Vì vậy, theo một khía cạnh đột biến bất kỳ mà ảnh hưởng đến việc gây cam tiền-mARN được bao hàm, nghĩa là đột biến mà cải biến quá trình gây cam tiền m-ARN thông thường, nhờ đó tạo ra một phân tử mARN khác.

Theo một khía cạnh, liên quan đến đột biến xóa đoạn, tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp mARN được phiên mã từ alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS, trong đó mARN này chứa sự xóa đoạn ít nhất 1, ít nhất 2, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 7, ít nhất 8, ít nhất 10, ít nhất 11, ít nhất 13, ít nhất 14 hoặc ít nhất 16 nucleotit so với trình tự mã hóa (ADN) tương ứng của alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS mà từ đó mARN được phiên mã. Theo một khía cạnh, các nucleotit bị xóa trong mARN là một hoặc nhiều nucleotit của exon 1, exon 2, exon 3 và/hoặc exon 4 của protein tương tự xylin SDS. Theo một khía cạnh, nucleotit là nucleotit của exon 2, chẳng hạn một hoặc nhiều hoặc tất cả các

nucleotit bắt đầu từ nucleotit 2186 và kết thúc ở nucleotit 2201 của SEQ ID NO 1.

Tốt hơn là, tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp mRNA được phiên mã từ alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, đặc trưng ở chỗ mRNA này chứa đột biến dịch chuyển khung và/hoặc đột biến vô nghĩa so với trình tự mã hóa (ADN) của alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS mà từ đó mRNA được phiên mã. Đột biến vô nghĩa này tạo ra codon kết thúc sớm trong mRNA mà gây ra sự cắt cụt đầu 3' của trình tự mã hóa mRNA và sự cắt cụt của protein tương tự xyclin SDS ở đầu tận cùng C. Vì vậy, theo một phương án sáng chế đề cập đến tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp mRNA được phiên mã từ alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, đặc trưng ở chỗ mRNA này chứa sự cắt cụt trình tự mã hóa so với trình tự mã hóa (ADN) của alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS từ đó mRNA được phiên mã. Sự cắt cụt của trình tự mã hóa mRNA của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS tốt hơn là sự cắt cụt của ít nhất 100 nucleotit, tốt hơn nữa là của ít nhất 200 nucleotit, thậm chí tốt hơn nữa là của ít nhất 300 nucleotit, tốt hơn nữa là của ít nhất 400 nucleotit và tốt hơn nữa là của ít nhất 500 nucleotit, đặc biệt tốt hơn là của ít nhất 591 so với trình tự mã hóa (ADN) của alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS mà từ đó mRNA này được phiên mã. Theo một khía cạnh, sự cắt cụt của trình tự mã hóa mRNA dẫn đến exon 2, 3 và 4 vắng mặt; hoặc exon 3 và 4 vắng mặt; hoặc exon 4 vắng mặt. Theo một khía cạnh khác, sự cắt cụt của trình tự mã hóa mRNA dẫn đến toàn bộ hoặc một phần của exon 1, toàn bộ exon 2, toàn bộ exon 3 và toàn bộ exon 4 vắng mặt. Theo một khía cạnh khác, đột biến dịch chuyển khung dẫn đến toàn bộ hoặc một phần của exon 2 thuộc một khung đọc khác. Theo một khía cạnh khác đột biến dịch chuyển khung dẫn đến toàn bộ hoặc một phần của exon 3 và/hoặc exon 4 thuộc một khung đọc khác. Sự dịch chuyển khung có thể được gây ra bởi sự xóa đoạn của một hoặc nhiều nucleotit (số bất kỳ mà không phải là bội số của 3, như 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, v.v.), bằng cách đó khung đọc bị thay đổi.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp mRNA có mức đồng nhất ít nhất 58% hoặc 60% tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90% hoặc

đặc biệt tốt hơn là ít nhất 95% với trình tự mã hóa (ADN) tương ứng được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 với điều kiện tiên quyết là trình tự mARN bao gồm ít nhất một đột biến vô nghĩa hoặc một codon kết thúc sớm so với trình tự mã hóa (ADN) tương ứng được chỉ ra trong SEQ ID NO 1, tốt hơn là, đột biến vô nghĩa xảy ra ở vị trí nucleotit 1096 đến 1098 trong SEQ ID NO 3. Theo một khía cạnh, codon kết thúc sớm ở nucleotit từ 1687 đến 1689 của SEQ ID NO: 1. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên của sáng chế, tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa mARN có trình tự nucleotit như được chỉ ra trong SEQ ID NO 3.

“Trình tự mã hóa mARN” sẽ có nghĩa thông thường sau đây. Trình tự mã hóa mARN tương ứng với trình tự mã hóa ADN tương ứng của gen/alen chỉ khác là thymin (T) được thay thế bằng uraxil (U).

Đối với đột biến bất kỳ trong số các đột biến được mô tả trên đây hoặc tổ hợp gồm các đột biến (nghĩa là xóa đoạn nucleotit dẫn đến sự dịch chuyển khung), cần hiểu rằng chúng dẫn đến sự giảm chức năng hoặc mất chức năng liên quan đến hoạt tính của protein tương tự xylin SDS ở tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật theo sáng chế.

Một phương án khác nữa của sáng chế đề cập đến tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật, chứa hoặc tổng hợp protein tương tự xylin SDS, đặc trưng ở chỗ trình tự axit amin của protein tương tự xylin SDS bao gồm đột biến so với protein tương tự xylin SDS kiểu đại tương ứng. Đột biến trong protein tương tự xylin SDS gây ra sự giảm hoặc mất chức năng đối với hoạt tính của protein tương tự xylin SDS ở tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật theo sáng chế.

Đặc biệt tốt hơn là tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp protein tương tự xylin SDS, đặc trưng ở chỗ trình tự axit amin của protein tương tự xylin SDS chứa đột biến so với protein tương tự xylin SDS kiểu đại tương ứng.

Đột biến trong protein tương tự xylin SDS có thể là sự thay thế axit amin, sự cài xen, sự xóa đoạn và/hoặc sự cắt đứt so với trình tự axit amin của protein tương tự xylin SDS kiểu đại. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, trình tự axit

amin của protein tương tự xyclin SDS bao gồm sự xóa đoạn hoặc sự cắt cụt, tốt hơn nữa là sự cắt cụt ở đầu tận cùng N và/hoặc đầu tận cùng C, thậm chí tốt hơn nữa là sự cắt cụt ở đầu tận cùng C. Tốt hơn là ít nhất 10, ít nhất 25, tốt hơn là ít nhất 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100, tốt hơn nữa là ít nhất 150 và thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 197 hoặc ít nhất 200, 250, 300 hoặc 339 axit amin bị mất từ đầu đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của trình tự axit amin so với protein tương tự xyclin SDS kiểu đại tương ứng. Đối với đầu tận cùng C, đột biến trong protein tương tự xyclin SDS là sự cắt cụt của ít nhất 25, tốt hơn là ít nhất 50, 60, 70, 80, 90, tốt hơn là ít nhất 100, tốt hơn nữa là ít nhất 150 và thậm chí tốt hơn nữa là của ít nhất 197 hoặc ít nhất 200, 250, 300 hoặc 339 axit amin so với protein tương tự xyclin SDS kiểu đại tương ứng. Theo một khía cạnh khác, đột biến trong protein tương tự xyclin SDS dẫn đến các axit amin được mã hóa bởi exon 2, 3 và 4 vắng mặt; hoặc các axit amin được mã hóa bởi exon 3 và 4 vắng mặt; hoặc các axit amin được mã hóa bởi exon 4 vắng mặt. Theo một khía cạnh khác, đột biến dẫn đến toàn bộ hoặc một phần của các axit amin được mã hóa bởi exon 1, toàn bộ các axit amin được mã hóa bởi exon 2, toàn bộ các axit amin được mã hóa bởi exon 3 và toàn bộ các axit amin được mã hóa bởi exon 4 vắng mặt. Theo một khía cạnh khác, đột biến này dẫn đến toàn bộ hoặc một phần của các axit amin được mã hóa bởi exon 2 được thay thế bằng các axit amin khác (chẳng hạn do sự dịch chuyển khung đọc). Theo một khía cạnh khác, đột biến dẫn đến các axit amin được mã hóa bởi toàn bộ hoặc một phần của exon 3 và/hoặc exon 4 được thay thế bằng các axit amin khác (chẳng hạn do sự dịch chuyển khung đọc). Theo một khía cạnh khác, đột biến dẫn đến toàn bộ hoặc một phần của miền xyclin\_C và/hoặc xyclin\_N vắng mặt. Theo một khía cạnh khác nữa, đột biến dẫn đến miền xyclin\_C và/hoặc xyclin\_N chứa một hoặc nhiều axit amin được thay thế, cài xen hoặc khuyết đoạn.

Các tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật theo sáng chế chứa hoặc tổng hợp protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất ít nhất 58% hoặc ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90% hoặc đặc biệt tốt hơn là ít nhất 95% với trình tự axit amin như được chỉ ra trong SEQ ID NO 4 hoặc trong SEQ ID NO 18. Theo một phương án được ưu tiên nhất, protein được chứa hoặc được tổng hợp trong tế bào thực vật, các phần của thực vật

hoặc thực vật có trình tự axit amin như được chỉ ra trong SEQ ID NO 4 hoặc trong SEQ ID NO: 18.

Vì vậy, theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến tế bào thực vật hoặc thực vật được chọn từ các loài dưa hấu, dưa, dưa chuột, cà chua và hồ tiêu chứa một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS đặc trưng ở chỗ alen đột biến này chứa hoặc thực hiện một hoặc nhiều trong số các đột biến được chọn từ nhóm gồm

a) xóa đoạn, cắt cụt, cài xen, đột biến điểm, đột biến vô nghĩa, đột biến sai nghĩa hoặc đột biến không cùng nghĩa, đột biến ở vị trí cắt, đột biến dịch chuyển khung trong trình tự bộ gen;

b) đột biến trong một hoặc nhiều trình tự điều tiết;

c) xóa đoạn, cắt cụt, cài xen, đột biến điểm, đột biến vô nghĩa, đột biến sai nghĩa hoặc đột biến không cùng nghĩa, đột biến ở vị trí cắt, đột biến dịch chuyển khung trong trình tự mã hóa;

d) xóa đoạn, cắt cụt, cài xen, đột biến điểm, đột biến vô nghĩa, đột biến sai nghĩa hoặc đột biến không cùng nghĩa, đột biến ở vị trí cắt, đột biến dịch chuyển khung trong tiền-mARN hoặc mARN; và/hoặc

e) sự xóa đoạn, cắt cụt, cài xen hoặc sự thay thế của một hoặc nhiều các axit amin trong protein tương tự xyclin SDS.

Alen đột biến nêu trên dẫn đến hoạt tính của thể đột biến protein tương tự xyclin SDS giảm so với protein tương tự xyclin SDS kiểu dại. Việc giảm hoạt tính là do sự loại bỏ hoàn toàn sự biểu hiện của gen tương tự xyclin SDS, sự giảm sự biểu hiện của gen, sự mất chức năng của protein đột biến đã được mã hóa tương tự xyclin SDS hoặc sự giảm chức năng của thể đột biến protein tương tự xyclin SDS.

Theo một khía cạnh, trong đó tế bào thực vật hoặc thực vật này là dưa hấu, alen đột biến của protein tương tự xyclin SDS là alen đột biến của alen mã hóa protein của SEQ ID NO: 2 hoặc protein có mức đồng nhất cơ bản về trình tự với SEQ ID NO: 2, tốt hơn là mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 60%, 70%, 80%, 90% khi chiều dài hai

trình tự của protein chức năng tương tự SDS được sắp thẳng hàng theo từng cặp.

Theo một khía cạnh khác, trong đó tế bào thực vật hoặc thực vật này là dưa, alen đột biến của protein tương tự xylin SDS là alen đột biến của alen mã hóa protein của SEQ ID NO: 6 hoặc protein có mức đồng nhất cơ bản về trình tự với SEQ ID NO: 6, tốt hơn là mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 60%, 70%, 80%, 90% khi hai trình tự với chiều dài đầy đủ của protein chức năng tương tự SDS được sắp thẳng hàng theo từng cặp.

Theo một khía cạnh khác, trong đó tế bào thực vật hoặc thực vật này là dưa chuột, alen đột biến của protein tương tự xylin SDS là alen đột biến của alen mã hóa protein của SEQ ID NO: 12 hoặc protein có mức đồng nhất cơ bản về trình tự với SEQ ID NO: 12, tốt hơn là mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 60%, 70%, 80%, 90% khi hai trình tự với chiều dài đầy đủ của protein chức năng tương tự SDS được sắp thẳng hàng theo từng cặp.

Theo một khía cạnh khác, trong đó tế bào thực vật hoặc thực vật này là cà chua, alen đột biến của protein tương tự xylin SDS là alen đột biến của alen mã hóa protein của SEQ ID NO: 19 hoặc protein có mức đồng nhất cơ bản về trình tự với SEQ ID NO: 19, tốt hơn là mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 60%, 70%, 80%, 90% khi hai trình tự với chiều dài đầy đủ của các protein chức năng tương tự SDS được sắp thẳng hàng theo từng cặp.

Theo một khía cạnh khác, trong đó tế bào thực vật hoặc thực vật này là hồ tiêu, alen đột biến của protein tương tự xylin SDS là alen đột biến của alen mã hóa protein có trình tự SEQ ID NO: 20 hoặc protein có mức đồng nhất cơ bản về trình tự với SEQ ID NO: 20, tốt hơn là mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 60%, 70%, 80%, 90% khi hai trình tự với chiều dài đầy đủ của protein chức năng tương tự SDS được sắp thẳng hàng theo từng cặp.

Theo một khía cạnh, thực vật dưa hấu, dưa, dưa chuột, cà chua hoặc hồ tiêu chứa alen tương tự xylin SDS đột biến ở dạng dị hợp tử. Theo một khía cạnh khác, thực vật dưa hấu, dưa, dưa chuột, cà chua hoặc hồ tiêu chứa alen tương tự xylin SDS đột biến ở dạng đồng hợp tử, nhờ đó thực vật này tạo ra quả không hạt nhờ sự thụ

phần với chính nó hoặc với phần khác. Theo một khía cạnh được ưu tiên, alen tương tự xyclin SDS đột biến là bất hoạt (nghĩa là gen này không được biểu hiện) hoặc alen mã hóa protein tương tự xyclin SDS không chức năng.

Hạt từ đó thực vật có thể phát triển được bao hàm trong sáng chế này cũng như là quả không hạt được sản xuất từ thực vật này khi alen này ở dạng đồng hợp tử hoặc quả có hạt được sản xuất từ thực vật này khi alen này ở dạng dị hợp tử. Ngoài ra, các phần bất kỳ của thực vật, như các đoạn cắt, vật liệu nhân giống sinh dưỡng, tế bào, v.v. chứa ít nhất một alen đột biến tương tự xyclin SDS trong bộ gen của chúng được đề xuất.

Ngoài ra, các tế bào nhân giống và không nhân giống chứa ít nhất một bản sao của alen đột biến tương tự xyclin SDS được đề cập đến trong bản mô tả này. Cần hiểu rằng các tế bào nhân giống hoặc không nhân giống như vậy có thể là một phần của cơ quan thực vật hoặc toàn bộ thực vật, hoặc chúng có thể được phân lập, chẳng hạn trong nuôi cấy tế bào hoặc mô.

Hạt, thực vật và các phần của thực vật được đề xuất trong bản mô tả này, chứa ít nhất một alen đột biến tương tự xyclin SDS trong bộ gen của chúng, tốt hơn là thực vật hữu dụng trong nông nghiệp, chẳng hạn các dòng lai gần, các dòng gây giống, các giống hoặc các cây trồng hoặc cây lai F1. Tốt hơn là chúng có các đặc tính nông học tốt, đặc biệt là tạo ra quả có thể bán trên thị trường với chất lượng quả tốt và tính đồng đều của quả.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “giống” hoặc “cây trồng” có nghĩa là thực vật được phân nhóm thuộc một nhóm đã được phân loại thực vật đơn lẻ có cấp bậc đã biết thấp nhất, có thể được xác định bởi sự biểu hiện của các đặc tính có được do một kiểu gen định trước hoặc tổ hợp của các kiểu gen định trước.

Cây “lai F1” (hoặc hạt lai F1) là thế hệ thu được từ việc lai chéo hai dòng bố mẹ lai cùng dòng. Vì vậy, hạt lai F1 là những hạt mà từ đó thực vật lai F1 trưởng thành. Cây lai F1 khỏe hơn và có sản lượng cao hơn, do ưu thế giống lai. Các dòng lai gần thực chất là đồng hợp tử ở hầu hết các locus trong bộ gen.

“Dòng thực vật” hoặc “dòng gây giống” dùng để chỉ thực vật và thế hệ con của

nó. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "dòng lai cùng dòng" dùng để chỉ dòng thực vật đã được tự nhân giống lặp lại và gần như là đồng hợp tử. Vì vậy, "dòng lai cùng dòng" hoặc "dòng bố mẹ" dùng để chỉ thực vật mà trải qua vài thế hệ (nghĩa là ít nhất 5, 6, 7 hoặc nhiều hơn) lai cùng dòng, tạo ra dòng thực vật có tính đồng nhất cao.

Alen tương tự xyclin SDS ở dưa hấu được định vị trên nhiễm sắc thể 7 (giữa nucleotit 7450185 và 7445051) của bộ gen. Sự định vị trên nhiễm sắc thể có thể được xác định bằng cách tiến hành BLAST đối với toàn bộ bộ gen, chẳng hạn trên trang web toàn cầu ở [icugi.org/pub/genome/watermelon/97103](http://icugi.org/pub/genome/watermelon/97103)). Alen tương tự xyclin SDS ở dưa chuột dường như cũng được định vị trên nhiễm sắc thể 5 (giữa nucleotit 848447 và 852718) của bộ gen dưa chuột (trang web toàn cầu ở [icugi.org/pub/genome/watermelon/Chinese\\_long/](http://icugi.org/pub/genome/watermelon/Chinese_long/)).

Đối với dưa hấu, alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có thể thu được từ hạt dưa hấu dị hợp tử hoặc đồng hợp tử đối với thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, nộp lưu dưới tên NCIMB 42532. Alen kiểu dại của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có thể thu được từ hạt dưa hấu dị hợp tử hoặc đồng hợp tử đối với gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS kiểu dại, được nộp lưu dưới tên NCIMB 42532. Đối với những hạt được nộp lưu, alen tương ứng của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS được gọi là *emb1*. Các alen đột biến khác của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có thể được tạo ra *de novo*, chẳng hạn bằng cách sinh đột biến hoặc bằng các phương pháp khác đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực. Điều này áp dụng đối với các loài thực vật bất kỳ.

Một ví dụ về việc tạo ra alen đột biến tương tự SDS *de novo* ở dưa hấu được đề xuất trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế đã tạo ra quần thể biến thể bằng cách tạo đột biến các hạt dưa hấu và sau đó sử dụng TILLING để nhận biết thực vật chứa alen đột biến tương tự SDS. Alen đã nhận biết chứa một thay thế nucleotit duy nhất ở nucleotit 1687 của SEQ ID NO: 1, tạo thành codon kết thúc. Vì vậy, alen đột biến mã hóa protein tương tự xyclin SDS đã bị cắt cụt chỉ bao gồm các axit amin 1 đến 223 của protein kiểu dại (xem SEQ ID NO: 18).

Tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật hoặc thế hệ con của nó có

thể thu được/thu được từ hạt dị hợp tử hoặc đồng hợp tử đối với alen của gen mã hóa protein tương tự SDS, được nộp lưu dưới tên NCIMB 42532 cũng là một phương án của sáng chế. Theo một phương án được ưu tiên, tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật hoặc thể hệ con của nó thu được từ hạt được nộp lưu dưới tên NCIMB 42532 đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa tương tự xyclin SDS. Một phương án được bao hàm khác của sáng chế đề cập đến tế bào thực vật, các phần của thực vật hoặc thực vật, đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS thu được/có thể thu được sau khi lai chéo cây dưa hấu thu được từ hạt có số lưu trữ NCIMB 42532 với một thực vật khác. Tốt hơn là, tế bào thực vật hoặc thực vật thu được/có thể thu được sau khi lai chéo một thực vật thu được từ hạt với số nộp lưu NCIMB 42532 với một thực vật khác được tự thụ phấn sau đó và tùy ý trong một bước tiếp theo, chọn lọc thực vật sản sinh ra quả không hạt và/hoặc chọn lọc thực vật đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa tương tự xyclin SDS.

Thuật ngữ “(các)alen” có nghĩa alen bất kỳ trong số một hoặc nhiều dạng thay thế của gen ở một locus cụ thể, tất cả các alen này đều liên quan đến một tính trạng hoặc một đặc tính ở một locus cụ thể. Ở tế bào lưỡng bội của một sinh vật, các alen của một gen đã nêu nằm ở một vị trí cụ thể, hoặc locus (nhiều loccus) trên nhiễm sắc thể. Một alen có mặt trên mỗi nhiễm sắc thể của cặp nhiễm sắc thể tương đồng. Các loài thực vật lưỡng bội có thể chứa một số lượng lớn các alen khác nhau ở một locus cụ thể. Các alen này có thể là các alen giống hệt của gen (đồng hợp tử) hoặc là hai alen khác nhau (dị hợp tử).

“Alen kiểu đại” trong bản mô tả này dùng để chỉ một kiểu gen mã hóa protein chức năng đầy đủ (protein kiểu đại). Trình tự của gen mã hóa protein chức năng đầy đủ tương tự xyclin SDS là trình tự mã hóa của các trình tự protein tương tự xyclin SDS kiểu đại như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 (từ dưa hấu đã được trồng) và SEQ ID NO 5 (từ dưa đã được trồng). Trình tự axit amin được mã hóa bởi gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS kiểu đại này được mô tả trong SEQ ID NO 2 hoặc SEQ ID NO 6, tương ứng. Các protein tương tự xyclin SDS kiểu đại khác là như được chỉ ra trong SEQ ID NO 12 (dưa chuột), SEQ ID NO: 19 (cà chua) và SEQ ID NO: 20 (hồ

tiêu). Các protein tương tự xylin SDS khác mã hóa trình tự axit nucleic mã hóa các alen protein chức năng đầy đủ tương tự xylin SDS (nghĩa là các alen biến thể, hoặc biến thể alen) tồn tại trong thực vật khác và có thể có mức đồng nhất cơ bản về trình tự với ít nhất trình tự mã hóa của trình tự axit nucleic như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 hoặc SEQ ID NO 5 hoặc với trình tự các axit amin như được chỉ ra trong SEQ ID NO 2 hoặc SEQ ID NO 6 hoặc SEQ ID NO: 12, hoặc SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 20. Ví dụ protein tương tự xylin SDS ở dưa chuột được trồng có SEQ ID NO 12 có mức đồng nhất về trình tự axit amin là 86% với protein tương tự xylin SDS kiểu dại của dưa (SEQ ID NO 6) và mức đồng nhất về trình tự axit amin là 70% với protein tương tự SDS kiểu dại của dưa hấu (SEQ ID NO 2).

“Alen đột biến” trong sáng chế này dùng để chỉ alen có sự đột biến so với alen kiểu dại tương ứng. Ví dụ về mARN được phiên mã từ alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS là như được chỉ ra trong SEQ ID NO 3. Trình tự axit amin tương ứng được mã hóa bởi mARN như được chỉ ra trong SEQ ID NO 3 là như được chỉ ra trong SEQ ID NO 4.

Thuật ngữ “locus” (số nhiều là loci) có nghĩa là vị trí hoặc các vị trí đặc hiệu hoặc một vị trí trên nhiễm sắc thể mà ở đó gen hoặc gen đánh dấu di truyền được tìm thấy.

“Sự đột biến” trong phân tử axit nucleic (ADN hoặc ARN) là sự thay đổi của một hoặc nhiều nucleotit so với trình tự kiểu dại tương ứng, chẳng hạn bằng sự thay thế, sự xóa đoạn hoặc sự cài xen của một hoặc nhiều nucleotit. Ví dụ về đột biến như vậy là đột biến điểm, đột biến vô nghĩa, đột biến sai nghĩa, đột biến ở vị trí cắt, đột biến dịch chuyển khung hoặc đột biến trong trình tự điều tiết.

“Phân tử axit nucleic” có nghĩa thông thường trong lĩnh vực. Nó bao gồm nucleotit chứa đường deoxyriboza (ADN) hoặc riboza (ARN).

“Đột biến điểm” là sự thay thế của một nucleotit duy nhất, hoặc sự cài xen hoặc sự xóa đoạn của một nucleotit duy nhất.

“Đột biến vô nghĩa” là đột biến (điểm) trong trình tự axit nucleic mã hóa protein, bằng cách đó một codon trong một phân tử axit nucleic được thay đổi thành

codon kết thúc. Điều này dẫn đến codon kết thúc sớm có mặt trong mARN và dẫn đến sự dịch mã protein đã bị cắt cụt. Protein đã bị cắt cụt có thể có chức năng giảm hoặc mất chức năng.

“Đột biến sai nghĩa hoặc đột biến không cùng nghĩa” là đột biến (điểm) trong trình tự axit nucleic mã hóa protein, nhờ đó một codon được thay đổi thành mã đối với một axit amin khác. Protein tạo thành có thể có chức năng giảm hoặc mất chức năng.

“Đột biến ở vị trí cắt” là đột biến trong trình tự axit nucleic mã hóa protein, nhờ đó ARN ghép nối tiền-mARN bị thay đổi, tạo thành một mARN có trình tự nucleotit khác và một protein có trình tự axit amin khác so với kiểu đại. Protein tạo thành có thể có chức năng giảm hoặc mất chức năng.

“Đột biến dịch chuyển khung” là đột biến trong trình tự axit nucleic mã hóa protein nhờ đó khung đọc của mARN bị thay đổi, tạo thành một trình tự axit amin khác. Protein tạo thành có thể có chức năng giảm hoặc mất chức năng.

“Sự xóa đoạn” trong phạm vi của sáng chế có nghĩa là ở bất cứ nơi nào trong một trình tự axit nucleic đã nêu, ít nhất một nucleotit bị mất so với trình tự nucleic của trình tự kiểu đại tương ứng hoặc ở bất cứ nơi nào trong trình tự axit amin đã nêu, ít nhất một axit amin bị mất so với trình tự axit amin của trình tự (kiểu đại) tương ứng.

“Sự cắt cụt” được hiểu có nghĩa là ít nhất một nucleotit ở đầu 3' hoặc đầu 5' của trình tự nucleotit bị mất so với trình tự nucleic của trình tự kiểu đại tương ứng hoặc có nghĩa là ít nhất một axit amin ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của protein bị mất so với trình tự axit amin của protein kiểu đại tương ứng, nhờ đó trong đầu 3' hoặc đầu tận cùng C, sự cắt cụt ít nhất nucleotit đầu tiên ở đầu 5' hoặc axit amin đầu tiên ở đầu tận cùng N, tương ứng, vẫn xảy ra, và ở đầu 5' hoặc đầu tận cùng N, sự cắt cụt ít nhất nucleotit cuối cùng ở đầu 3' hoặc axit amin cuối cùng ở đầu tận cùng C, tương ứng, vẫn xảy ra. Đầu 5' được xác định bởi codon ATG được sử dụng làm codon khởi đầu trong dịch mã trình tự axit nucleic kiểu đại tương ứng.

“Sự thay thế” có nghĩa là ít nhất một nucleotit trong trình tự axit nucleic hoặc một axit amin trong trình tự protein khác với trình tự axit nucleic kiểu đại tương ứng hoặc trình tự axit amin kiểu đại tương ứng, tương ứng, do sự thay đổi của một

nucleotit trong trình tự mã hóa của protein tương ứng.

“Sự cài xen” có nghĩa là trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin của protein chứa ít nhất một nucleotit hoặc axit amin khác so với trình tự axit nucleic kiểu đại tương ứng hoặc trình tự axit amin kiểu đại tương ứng, tương ứng.

“Codon kết thúc sớm” trong ngữ cảnh của sáng chế này có nghĩa là codon kết thúc có mặt trong trình tự mã hóa (cds) gần với codon khởi đầu này ở đầu 5’ hơn so với codon kết thúc của trình tự mã hóa kiểu đại tương ứng.

“Đột biến trong trình tự điều tiết”, chẳng hạn trong trình tự khởi đầu hoặc trình tự tăng cường của một gen, là sự thay đổi một hoặc nhiều nucleotit so với trình tự kiểu đại, chẳng hạn bởi sự thay thế, sự xóa đoạn hoặc sự cài xen của một hoặc nhiều nucleotit, ví dụ dẫn đến sản phẩm phiên mã mRNA của gen bị giảm hoặc không được tạo ra.

“Đồng hợp tử” được đề cập đến trong bản mô tả này có nghĩa là tất cả các bản sao của một gen hoặc alen đã nêu ở locus tương ứng trên nhiễm sắc thể thuộc tế bào hoặc sinh vật là giống hệt nhau. “Đồng hợp tử đối với một alen đột biến” có nghĩa là tất cả các bản sao của alen đột biến tương ứng ở locus tương ứng trên nhiễm sắc thể thuộc tế bào hoặc sinh vật là giống hệt nhau.

“Dị hợp tử” được đề cập đến trong bản mô tả này có nghĩa là ít nhất một bản sao của một gen hoặc alen đã nêu ở một locus đặc hiệu trên nhiễm sắc thể thuộc tế bào hoặc sinh vật khác với các bản sao khác của (các) gen hoặc (các) alen ở locus/các locus tương ứng trên (các) nhiễm sắc thể khác. “Dị hợp tử đối với một alen đột biến” có nghĩa là ít nhất một alen ở một locus đặc hiệu trên nhiễm sắc thể thuộc tế bào hoặc sinh vật có trình tự khác với (các) alen ở locus/các locus tương ứng trên (các) nhiễm sắc thể khác.

“Đột biến ở protein” là sự thay đổi của một hoặc nhiều gốc axit amin so với trình tự kiểu đại, chẳng hạn bởi sự thay thế, sự xóa đoạn, sự cắt cụt hoặc sự cài xen một hoặc nhiều gốc axit amin.

Các phương pháp công nghệ sinh học để đưa các đột biến vào gen/alen mong muốn của thực vật hoặc tế bào thực vật là đã biết trước đây. Vì vậy, các alen đột biến

của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS có thể được tạo ra trong tế bào thực vật hoặc thực vật bằng cách sử dụng các phương pháp này. Ví dụ về các kỹ thuật này đặc biệt là kỹ thuật gây đột biến hoặc các enzym mà gây ra sự đứt gãy ADN sợi kép (enzyme gây đứt gãy ADN sợi kép (enzym gây đứt gãy ADN sợi kép - DSBI)) trong bộ gen của thực vật. Các kỹ thuật đã biết và đã được thực hành là endonucleaza ít phân cắt và endonucleaza ít phân cắt được thiết kế theo yêu cầu bao gồm nhưng không giới hạn ở endonucleaza tìm nhà, còn được gọi là meganucleaza, các chất tác động tương tự chất hoạt hóa phiên mã được dung hợp thành miền xúc tác của nucleaza (TALEN) và còn được gọi là hệ CRISPR/Cas.

Tất cả các kỹ thuật này là thích hợp để đưa đột biến vào các gen trong tế bào thực vật hoặc thực vật. Vì vậy, tế bào thực vật và thực vật theo sáng chế mang alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS, trong đó đột biến thành alen đột biến được đưa vào bằng endonucleaza ít phân cắt hoặc endonucleaza ít phân cắt được thiết kế theo yêu cầu cũng là một phương án của sáng chế. Đối với endonucleaza ít phân cắt được thiết kế theo yêu cầu, tốt hơn là đột biến trong alen đột biến của protein tương tự xylin SDS được đưa vào bằng meganucleaza, TALENs hoặc hệ CRISPR/Cas.

Như được sử dụng ở đây, “enzym gây đứt gãy ADN sợi kép (DSBI)” là enzym có khả năng gây ra sự đứt gãy ADN sợi kép ở một trình tự nucleotit cụ thể, được gọi là “vị trí nhận biết”. Endonucleaza ít phân cắt là enzym DSBI có vị trí nhận biết gồm khoảng 14 đến 70 nucleotit bảo toàn, và vì vậy có tần suất phân cắt rất thấp, thậm chí ở các bộ gen lớn hơn như hầu hết các bộ gen thực vật.

“Endonucleaza tìm nhà, còn được gọi là meganucleaza”, tạo thành một họ gồm các endonucleaza ít phân cắt như vậy. Chúng có thể được mã hóa bởi các intron, các gen độc lập hoặc các trình tự xen vào, và có các đặc tính cấu trúc và chức năng nổi bật đáng chú ý mà phân biệt chúng với các enzym giới hạn cổ điển hơn, thường là từ hệ cải biến giới hạn Typ II ở vi khuẩn. Vị trí nhận biết của chúng có tính bất đối nói chung mà nó trái ngược với tính bất đối đôi đặc trưng của hầu hết các vị trí nhận biết enzym giới hạn. Một số endonucleaza tìm nhà được mã hóa bởi intron hoặc intein đã được chỉ ra là thúc đẩy việc tìm nhà của các yếu tố di truyền tương ứng của chúng vào

các vị trí không có intron hoặc intein trong alen. Bằng cách làm đứt sợi kép đặc hiệu vị trí trên các alen không intron hoặc không intein, các nucleaza này tạo ra các đầu các đầu gây tái tổ hợp, mà nó tham gia vào quá trình chuyển hóa gen mà nó nhân đôi trình tự mã hóa và dẫn đến sự cài xen của một intron hoặc một trình tự can thiệp ở mức ADN.

Danh sách các meganucleaza ít phân cắt khác và các vị trí nhận biết tương ứng của chúng được đưa ra trong bảng I của WO 03/004659 (các trang 17 đến 20) (được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn). Các enzym này bao gồm I-Sce I, I-Chu I, I-Dmo I, I-Cre I, I-Csm I, PI-Fli I, Pt-Mtu I, I-Ceu I, I-Sce II, I-Sce III, HO, PI-Civ I, PI-Ctr I, PI-Aae I, PI-BSU I, PI-DhaI, PI-Dra I, PI-Mav I, PI-Mch I, PI-Mfu I, PI-Mfl I, PI-Mga I, PI-Mgo I, PI-Min I, PI-Mka I, PI-Mle I, PI-Mma I, PI-Msh I, PI-Msm I, PI-Mth I, PI-Mtu I, PI-Mxe I, PI-Npu I, PI-Pfu I, PI-Rma I, PI-Spb I, PI-Ssp I, PI-Fac I, PI-Mja I, PI-Pho I, PI-Tag I, PI-Thy I, PI-Tko I hoặc PI-Tsp I.

Ngoài ra, các phương pháp sẵn có để thiết kế “endonucleaza ít phân cắt được thiết kế theo yêu cầu” mà nhận biết một cách đơn giản trình tự nucleotit đích bất kỳ được lựa chọn. Tóm lại, các enzym giới hạn ở dạng khảm có thể được điều chế bằng cách sử dụng các thể lai giữa miền ngón tay kềm được thiết kế để nhận biết một trình tự nucleotit đặc hiệu và miền phân cắt ADN không đặc hiệu từ enzym giới hạn có trong tự nhiên, như FokI. Các phương pháp như vậy đã được mô tả trong WO 03/080809, WO94/18313 hoặc WO95/09233 và trong Isalan et al., 2001, Nature Biotechnology 19, 656- 660; Liu et al. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5525-5530 chẳng hạn. Meganucleaza được tạo ra theo yêu cầu có thể được sản xuất bằng cách chọn lọc từ thư viện gồm các biến thể, như được mô tả trong WO2004/067736. Meganucleaza được tạo ra theo yêu cầu với tính đặc hiệu trình tự và ái lực gắn kết ADN thay đổi cũng có thể thu được nhờ việc thiết kế một cách hợp lý như được mô tả trong WO2007/047859.

Một ví dụ khác về endonucleaza được thiết kế theo yêu cầu bao gồm endonucleaza còn được gọi là “TALE nucleaza (TALEN)”, mà dựa trên các chất tác động tương tự chất hoạt hóa phiên mã (TALE) từ bộ gen vi khuẩn *Xanthomonas* được dung hợp với miền xúc tác của nucleaza (chẳng hạn FOKI). Tính đặc hiệu gắn kết

ADN của các TALE này được xác định bằng hai gốc lặp có thể thay đổi (repeat-variable diresidues - RVD) gồm các đơn vị lặp 34/35-axit amin được sắp xếp ngẫu nhiên, như một RVD nhận biết đặc hiệu một nucleotit trong ADN đích. Các đơn vị lặp này có thể được lắp ráp để nhận biết một cách đơn giản các trình tự đích bất kỳ và được dung hợp với miền xúc tác của một nucleaza tạo ra các endonucleaza đặc hiệu trình tự (xem tài liệu Boch et al., 2009, Science 326:p1509-1512; Moscou and Bogdanove, 2009, Science 326:p1501; Christian et al., 2010, Genetics 186:p757-761; và WO10/079430, WO11/072246, WO2011/154393, WO11/146121, WO2012/001527, WO2012/093833, WO2012/104729, WO2012/138927, WO2012/138939 chẳng hạn). WO2012/138927 cũng mô tả các (khối) monome TALEN và TALEN với các miền xúc tác khác nhau và tổ hợp của nó.

Gần đây, một loại hệ endonucleaza mới có thể tạo ra theo yêu cầu đã được mô tả; hệ này còn được gọi là “hệ CRISPR/Cas”, sử dụng một phân tử ARN đặc hiệu (crARN) có tính đặc hiệu trình tự để tác động đến sự phân cắt của nucleaza Cas9 có liên quan (Jinek et al, 2012, Science 337:p816-821). Endonucleaza ít phân cắt được thiết kế theo yêu cầu còn được đề cập đến như là endonucleaza ít phân cắt không xuất hiện trong tự nhiên.

Một phương pháp khác đã biết trước đây để đưa đột biến vào gen/alen của thực vật hoặc tế bào thực vật còn được gọi là "sinh đột biến *in vivo*". Thảo luận tiếp theo về kỹ thuật tương ứng này được nêu trong phần mô tả dưới đây.

Tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế mang alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS, trong đó đột biến được đưa vào alen đột biến này bằng cách sinh đột biến *in vivo* cũng là một phương án của sáng chế.

Các kỹ thuật khác nhau thường đã biết trước đây thích hợp để tạo ra đột biến cài xen ở tế bào thực vật hoặc thực vật.

Các phương án khác của sáng chế là tế bào thực vật và thực vật theo sáng chế mang alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS, trong đó đột biến được đưa vào alen đột biến này bằng cách sinh đột biến nhờ cài xen.

Tế bào thực vật theo sáng chế và thực vật theo sáng chế chứa alen đột biến của

gen mã hóa protein tương tự xylin SDS có thể được tạo ra bằng kỹ thuật còn được gọi là sinh đột biến bằng cài xen. Đặc biệt là, sự cài xen các gen nhảy và các trình tự ADN vận chuyển (T-ADN) vào các gen/alien mã hóa protein tương tự xylin SDS là thích hợp để làm giảm sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của các gen/alien tương ứng trong đó chúng được hợp nhất (Thorneycroft et al., 2001, *Journal of experimental Botany* 52 (361), 1593-1601).

Thảo luận kỹ hơn về các kỹ thuật tương ứng đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực sẽ được đưa ra dưới đây trong bản mô tả này.

“Sinh đột biến nhờ cài xen” được hiểu có nghĩa là một cách cụ thể, sự cài xen của các gen nhảy hoặc còn được gọi là ADN vận chuyển (T-ADN) vào gen mã hóa protein tương tự xylin SDS, bằng cách đó khiến cho hoạt tính của protein tương tự xylin SDS trong tế bào qaun tâm bị giảm hoặc protein không chức năng tương tự xylin SDS được tạo ra.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, thực vật theo sáng chế là cây hữu thụ đực.

Thực vật theo sáng chế là hữu thụ đực và tạo ra quả không hạt khi alien đột biến tương tự xylin SDS có mặt ở dạng đồng hợp tử. Lợi ích của cây hữu thụ đực so với cây bất thụ đực là ở chỗ chúng sẽ tạo ra phần hữu thụ và vì vậy không cần phải trồng một cây thứ hai, còn được gọi là cây thụ phấn trên cùng một cánh đồng để tạo ra sự đậu quả và sự phát triển cây đực sản sinh quả không hạt. Vì vậy, toàn bộ diện tích canh tác có thể được trồng thực vật sản sinh quả không hạt, dẫn đến làm tăng sản lượng của quả không hạt trên một diện tích canh tác. Ngoài ra, cây đực và các phần cây đực ra hoa và thụ tinh cùng lúc, do noãn và phấn được tạo ra bởi cùng một cây. Điều này đảm bảo cho sự thụ phấn đầy đủ xảy ra để sản xuất ra lượng quả nhiều nhất có thể.

Trong ngữ cảnh của sáng chế này, “cây hữu thụ đực” được hiểu là cây tạo ra phấn có thể tồn tại. Hạt phấn có thể tồn tại hoặc hạt phấn hữu thụ được tạo ra chẳng hạn bằng cách sử dụng phấn từ cây tương ứng để thụ phấn chéo với một cây khác và thu nhận hạt có thể sống sót từ cây lai chéo này.

Theo một khía cạnh, kiểu hình tạo quả không hạt của thực vật theo sáng chế không chỉ được tạo ra ở các cây lưỡng bội mà còn được tạo ra ở các cây bội thể. Theo một khía cạnh, thực vật theo sáng chế cũng tạo ra quả không hạt khi chúng có mức bội thể khác nhau. Vì vậy, cần hiểu rõ rằng tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế bao gồm thực vật có mức độ bội thể bất kỳ bao gồm thực vật với mức bội thể là số chẵn ( $2n$ ,  $4n$ ,  $6n$ ,  $8n$  v.v.) và thực vật với mức bội thể là số lẻ ( $3n$ ,  $5n$  v.v.). Theo một khía cạnh, gen đột biến mã hóa protein tương tự cyclin SDS là đồng hợp tử ở các cây lưỡng bội, nhưng theo một khía cạnh khác, protein đột biến tương tự SDS là đồng hợp tử ở các cây đa bội, như dưa hấu tứ bội. “Đồng hợp tử ở thực vật đa bội” có nghĩa là locus trên mỗi nhiễm sắc thể bao gồm alen đột biến và không bao gồm alen kiểu dại của gen này.

Sự đa bội là phổ biến ở thực vật. Nó chịu trách nhiệm cho việc gia tăng tính đa dạng di truyền và tạo ra các loài có tình trạng khỏe mạnh, kích thước, sức sống và tính kháng bệnh gia tăng. Những lợi ích hiển nhiên của thực vật đa bội là ưu thế lai và sự dư thừa gen.

Một số cây trồng trong vườn và trên cánh đồng canh tác lớn đã trải qua một hoặc nhiều lần sao chép bộ gen. Ví dụ là bông (hệ số nhân  $\times 6$ ), potato ( $\times 2$ ,  $\times 3$ ), lúa mì ( $\times 3$ ), hạt lấy dầu ( $\times 3$ ), ngô ( $\times 2$ ), đậu tương ( $\times 2$ ), hướng dương ( $\times 2$ ), chuối ( $\times 2$ ), táo ( $\times 2$ ) và cà phê ( $\times 2$ ) (Renny-Byfield & Wendel, 2014, *American J. Botany*, 101(10), 1711-1725).

Đặc biệt là trong quá trình nhân giống thực vật, đa bội ở các thực vật khác nhau được gây ra bằng cách sử dụng các hóa chất bao gồm colchicine, colchamine, oryzalin, colcemid, trifluralin hoặc amiprophosmetyl. Ví dụ về sự sao chép bộ gen ở thực vật được tạo ra bằng cách sử dụng các hóa chất là cải brussels lưỡng bội từ thực vật đơn bội ( $2x$ ), đậu tứ bội ( $2x$ ), dưa hấu tứ bội ( $2x$ ), dưa thơm tứ bội ( $2x$ ), hành tứ bội ( $2x$ ), cây củ môn tám bội ( $4x$ ), tứ bội bầu rấn ( $2x$ ), bí ngô có khía tam bội và tứ bội ( $1,5x$ ,  $2x$ ), dưa chuột tứ bội ( $2x$ ) và đậu phộng tứ bội ( $2x$ ) (Kazi, 2015, *J. Global Biosciences* 4(3), 1774-1779).

Thực vật chứa một alen đột biến của một gen mã hóa protein tương tự cyclin

SDS có thể được tạo ra bằng các phương pháp khác nhau thường đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực. Các phương pháp này bao gồm sử dụng hạt được nộp lưu dưới số truy cập NCIMB 42532. Một lợi ích cụ thể của các hạt đã được nộp lưu này là ở chỗ thực vật được sinh trưởng từ các hạt này chứa alen đột biến sẽ hữu thụ được. Vì vậy, alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mặt trong các thực vật này có thể được đưa vào một thực vật khác bằng cách sử dụng phấn của thực vật chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS để thụ tinh cho thực vật khác, đặc biệt là cây dưa hấu khác, đặc biệt là dưa hấu được trồng. Do alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS là lặn, sự tạo quả không hạt chỉ được nhận thấy nếu không có alen kiểu đại trội nào của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mặt trong cây tương ứng. Vì vậy, trong trường hợp alen kiểu đại của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mặt trong thực vật, các thực vật này tạo ra quả có hạt. Khi chuyển một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS từ hạt lưỡng bội, đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS (chẳng hạn từ số nộp lưu NCIMB 42532 hoặc thế hệ con của nó) vào một thực vật khác không chứa alen đột biến lặn của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, thế hệ F1 sẽ là dị hợp tử và sẽ không thể hiện kiểu hình quả không hạt. F1 trước tiên cần tự thụ phấn để thu được thực vật chứa kiểu hình quả không hạt do có mặt hai bản sao (đồng hợp tử) của alen đột biến lặn.

Thực vật lưỡng bội chứa hai bản sao của alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có thể được sử dụng để tạo ra thực vật tứ bội chứa bốn bản sao của alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Thực vật tứ bội này sẽ có cùng kiểu hình với thực vật lưỡng bội, nghĩa là tạo quả không hạt (mà là tứ bội) và phần hữu thụ.

Khi chuyển một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS từ thực vật tứ bội vào một thực vật tứ bội khác không chứa alen đột biến lặn của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, thế hệ F1 sẽ là dị hợp tử và không thể hiện kiểu hình quả không hạt. Ngoài ra, kiểu hình quả không hạt sẽ chỉ được nhìn thấy ở thế hệ thu được từ thế hệ F1 tự thụ phấn.

Như đã nêu, thực vật tứ bội chứa kiểu hình quả không hạt có thể được tạo ra

bằng cách sao chép các nhiễm sắc thể của thực vật lưỡng bội đồng hợp tử đối với alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS (chẳng hạn từ hạt, đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS từ số nộp lưu NCIMB 42532 hoặc từ thực vật đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS thu được sau khi lai chéo thực vật thu được từ hạt có số nộp lưu NCIMB 42532 với một thực vật khác và sau đó tùy ý tự thụ phấn thực vật thu được từ thực vật lai đã nêu). Thực vật tứ bội thu được bao gồm bốn bản sao của alen đột biến của alen đột biến gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS.

Trước đây thường hiểu rằng tế bào sinh sản hữu tính của thực vật (phấn và noãn) bao gồm một bộ các nhiễm sắc thể mà là một nửa của bộ các tế bào hiện có của thực vật này. Phấn hoa thực vật và noãn có thể được tái tạo thành thực vật hoàn chỉnh. Do thực vật có mức bội thể là số chẵn, thường có thể giảm mức bội thể đi một nửa nhờ sự tái tạo của phấn hoa hoặc noãn. Từ thực vật theo sáng chế với mức bội thể là số chẵn (chẳng hạn  $2n$ ,  $4n$ ,  $6n$ ,  $8n$  v.v.), thực vật có bộ nhiễm sắc thể chia đôi (chẳng hạn  $1n$ ,  $2n$ ,  $3n$ ,  $4n$ , v.v., tương ứng) có thể được tạo ra bằng cách tái sinh nhờ phấn hoa hoặc noãn.

Các cây lưỡng bội theo sáng chế có thể được tái sinh từ tế bào phấn hoa hoặc noãn chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, tế bào phấn hoa hoặc noãn thu được từ thực vật tứ bội chứa một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Tốt hơn là, tế bào phấn hoa hoặc noãn thu được từ thực vật tứ bội chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS ở trạng thái đồng hợp tử. Các cây lưỡng bội tạo ra sau đó có thể được sử dụng trong quá trình gây giống tiếp theo và trong quá trình tạo ra thực vật có kiểu hình quả không hạt.

Thực vật tam bội có thể được tạo ra bằng cách nhân chéo thực vật lưỡng bội ( $2n$ ) theo sáng chế với thực vật tứ bội ( $4n$ ) theo sáng chế. Hạt của thực vật lai có nguồn gốc từ thực vật lai chéo đã nêu sẽ là tam bội ( $3n$ ). Tốt hơn là thực vật lưỡng bội ( $2n$ ) và tứ bội ( $4n$ ) theo sáng chế được lai chéo với nhau đều là đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Hạt tam bội thu được (và thực vật tam bội được sinh trưởng từ hạt này) sẽ có ba bản sao alen đột biến. Thực vật lưỡng bội được sử dụng để tạo ra thực vật lai tam bội có thể là thực vật thu

được/có thể thu được từ hạt đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS thu được từ hạt có số nộp lưu NCIMB 42532 chẳng hạn.

Thực vật (chẳng hạn lưỡng bội, tam bội hoặc tứ bội, hoặc bội thể khác) và các phần của thực vật (như quả) chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có thể thu được/thu được bằng một trong số các phương pháp vừa được mô tả cũng là một phương án của sáng chế. Ngoài ra, hạt mà từ đó thực vật như vậy có thể sinh trưởng là một phương án của sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế có mức bội thể là số chẵn, tốt hơn là, chúng là lưỡng bội ( $2n$ ) hoặc tứ bội ( $4n$ ).

Thực vật với mức bội thể là số lẻ, chẳng hạn thực vật tam bội ( $3n$ ) thường là bất thụ đực và cái, do trong quá trình phân bào giảm nhiễm các nhiễm sắc thể không thể được chia đều vào các tế bào con. Lợi ích của thực vật với mức bội thể là số chẵn, chẳng hạn thực vật lưỡng bội ( $2n$ ) hoặc tứ bội ( $4n$ ) so với thực vật với mức bội thể là số lẻ, chẳng hạn thực vật tam bội ( $3n$ ) là ở chỗ thực vật có mức bội thể là số chẵn có thể tạo ra phần hữu thụ và/hoặc noãn hữu thụ. Kết quả là, thực vật có mức bội thể là số chẵn có thể được sinh trưởng mà không cần đến cây thứ hai khác còn được gọi là cây thụ phấn cần để tạo ra hệ quả và sự phát triển ở thực vật với mức bội thể là số lẻ. Các cây thụ phấn cũng sẽ tạo ra quả mà thường sẽ mang hạt (hoặc có hạt). Các quả mang hạt này cần phải được tách riêng khỏi quả không hạt ngay khi hoặc sau khi thu hoạch. Vì vậy, thực vật có mức bội thể là số chẵn có lợi hơn thực vật có mức bội thể là số lẻ ở chỗ không cần tách riêng các quả mang hạt không mong muốn được tạo ra bởi các cây thụ phấn ra khỏi quả không hạt mong muốn.

“Mức bội thể là số chẵn” trong bản mô tả này có nghĩa là số bộ nhiễm sắc thể tương đồng có mặt trong tế bào hoặc sinh vật khi chia cho hai tạo ra một số nguyên. Vì vậy, tế bào hoặc sinh vật là lưỡng bội ( $2n$ ), tứ bội ( $4n$ ), sáu bội ( $6n$ ), tám bội ( $8n$ ) v.v..

“Mức bội thể là số lẻ” trong sáng chế này có nghĩa là số bộ nhiễm sắc thể tương đồng có mặt trong tế bào hoặc sinh vật khi chia cho hai tạo ra một số nguyên.

Vì vậy, tế bào hoặc sinh vật là đơn bội ( $1n$ ), tam bội ( $3n$ ) v.v.

“Tế bào thực vật hoặc thực vật lưỡng bội” trong ngữ cảnh của sáng chế này có nghĩa là thực vật, phần sinh dưỡng của thực vật, quả hoặc hạt hoặc tế bào thực vật, có hai bộ nhiễm sắc thể tương ứng, trong bản mô tả này được gọi là  $2n$ .

“Tế bào hoặc thực vật tứ bội” trong ngữ cảnh của sáng chế này có nghĩa là thực vật, (các) phần sinh dưỡng của thực vật, quả hoặc hạt hoặc tế bào thực vật, có bốn bộ nhiễm sắc thể tương ứng, trong bản mô tả này được gọi là  $4n$ .

Tế bào thực vật theo sáng chế có thể là tế bào thực vật mà có thể được tái sinh thành thực vật hoàn chỉnh hoặc tế bào thực vật mà không thể được tái sinh thành thực vật hoàn chỉnh. Vì vậy, tế bào thực vật theo sáng chế có thể là tế bào thực vật mà không thích hợp để tái sinh thành một thực vật hoàn chỉnh.

Theo một phương án được ưu tiên, thực vật theo sáng chế là hữu thụ đực và có mức bội thể là số chẵn. Tốt hơn là, thực vật theo sáng chế là hữu thụ đực và là lưỡng bội ( $2n$ ) hoặc tứ bội ( $4n$ ).

Theo một phương án được ưu tiên khác, thực vật theo sáng chế là thực vật có hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả. Tốt hơn nữa là thực vật theo sáng chế là thực vật hữu thụ đực có hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả. Thậm chí tốt hơn nữa là thực vật theo sáng chế là hữu thụ đực, hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả và có mức bội thể là số chẵn. Đặc biệt tốt hơn là, thực vật theo sáng chế là hữu thụ đực, hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả, lưỡng bội ( $2n$ ) hoặc tứ bội ( $4$ ).

Thực vật có hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả tạo ra quả không hạt. Thực vật hữu thụ đực có hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả có lợi hơn thực vật có hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả đã biết ở chỗ chúng không cần thực vật thụ phấn khác được trồng ở cùng khu vực trong khi các cây này lại không hề tạo ra quả không hạt. Các cây thụ phấn sẽ tạo ra quả mang hạt không mong muốn, mà quả này sẽ cần phải được tách riêng ra khỏi quả không hạt. Vì vậy, cây hữu thụ đực có hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả có lợi ở chỗ không có sự cạnh tranh khoảng không gian sinh trưởng và chất dinh dưỡng giữa thực vật sản xuất

quả không hạt mong muốn và thực vật thụ phấn, điều này làm gia tăng sản lượng của quả không hạt mong muốn tính trên một diện tích gieo trồng sẵn có.

“Hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả” thường được hiểu trước đây và cũng được hiểu liên quan đến sáng chế này có nghĩa là sự hình thành hệ quả và sự phát triển đòi hỏi sự thụ phấn nhưng quả không tạo ra hạt trưởng thành hoặc có thể sống sót. Hạt trưởng thành hoặc có thể sống sót không được phát triển ở thực vật có hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả do sự phát triển của hạt bị kìm hãm hoặc do sự phá hủy của noãn và/hoặc phôi và/hoặc nội nhũ hoặc sự thui chột của noãn và/hoặc phôi và/hoặc nội nhũ trước khi chín.

Để phân biệt với hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả là tạo quả mà không cần thụ tinh. “Tạo quả mà không cần thụ tinh” thường được hiểu trước đây và cũng được hiểu liên quan đến sáng chế này để mô tả sự phát triển của quả mà không cần sự thụ tinh của noãn từ cây cái. Quá trình thụ phấn không được cần đến để tạo ra quả mà quả này không hạt do không có sự thụ phấn.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa của sáng chế, thực vật theo sáng chế sản sinh quả không hạt.

Quả của thực vật theo sáng chế có thể chứa các cấu trúc mà có hình dạng bên ngoài giống như hạt. Các cấu trúc này có hình dạng bên ngoài giống như hạt thường có màu trắng và mềm so với hạt của thực vật kiểu đại mà có màu nâu sẫm hoặc màu đen sẫm và cứng. Các cấu trúc có hình dạng bên ngoài giống như hạt ở quả của thực vật theo sáng chế đôi khi được gọi là hạt lép. Tuy nhiên, chúng thực sự không phải là hạt, do chúng không bao gồm phôi có thể sinh sản được mà là các cấu trúc bắt nguồn từ vỏ của noãn.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa của sáng chế, thực vật theo sáng chế tạo ra quả không hạt và/hoặc hữu thụ đực và/hoặc có mức bội thể là số chẵn và/hoặc có hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả. Thậm chí tốt hơn nữa là, thực vật theo sáng chế tạo ra quả không hạt, là thực vật hữu thụ đực, lưỡng bội ( $2n$ ) hoặc tứ bội ( $4n$ ) và có hạt bị thui trong quá trình phát triển sớm của quả.

Thuật ngữ “quả” theo nghĩa thực vật của nó thường được hiểu là cấu trúc mang

hạt được phát triển từ noãn của hoa của cây hạt kín.

“Quả không hạt” là như thường được sử dụng trước đây và đặc biệt là trong gây giống, mặc dù đôi khi trái với nghĩa thực vật của “quả”, trong ngữ cảnh của sáng chế này được hiểu như là quả mang không chứa hạt trưởng thành hoặc có thể sống sót. Hạt trưởng thành hoặc có thể sống sót có thể được nảy mầm trong đất trong các điều kiện thích hợp đối với thực vật tương ứng và sinh trưởng thành thực vật. Thử nghiệm này có thể được sử dụng để xác định xem liệu một thực vật có tạo ra quả không hạt hay không. Quả không hạt sẽ không tạo ra hạt mà hạt này sẽ nảy mầm và sinh trưởng thành thực vật trong các điều kiện thích hợp đối với thực vật tương ứng.

Bằng cách hiểu rõ gen nguyên nhân gây ra sự tạo ra quả không hạt được bộc lộ trong bản mô tả này, hiện nay đã có thể tạo ra thực vật tạo ra quả không hạt bằng các phương pháp đã biết khác nhau. Các phương pháp này có thể dựa trên sự tạo ra và chọn lọc thực vật mang các alen đột biến mã hóa protein không chức năng tương tự cyclin SDS hoặc các alen đột biến mã hóa protein tương tự cyclin SDS có chức năng giảm hoặc mất chức năng hoặc bằng cách sử dụng các tác nhân gây đột biến thông thường như hóa chất, bức xạ năng lượng cao (chẳng hạn tia x, bức xạ neutron, bức xạ gamma hoặc bức xạ UV). Cũng có thể tạo ra thực vật chứa protein không chức năng tương tự cyclin SDS hoặc chứa protein tương tự cyclin SDS với hoạt tính giảm bằng các kỹ thuật đã biết.

Thực vật theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách đưa một hoặc nhiều đột biến vào alen của gen mã hóa protein tương tự cyclin SDS.

Vì vậy, theo một phương án khác sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thực vật bao gồm các bước:

- a) đưa đột biến vào quần thể thực vật
- b) chọn lọc thực vật hữu thụ được tạo quả không hạt
- c) xác minh xem liệu thực vật được chọn lọc ở bước b) có đột biến ở một alen của gen mã hóa protein tương tự cyclin SDS hay không, tùy ý
- d) sinh trưởng/trồng thực vật thu được ở bước c).

Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra thực vật

bao gồm các bước:

- a) đưa đột biến vào quần thể thực vật
- b) chọn lọc thực vật hữu thụ đực tạo quả không hạt
- c) xác minh xem liệu thực vật được chọn lọc ở bước b) có đột biến ở alen mã hóa gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hay không và chọn lọc thực vật mang đột biến như vậy, và tùy ý
- d) sinh trưởng/trồng thực vật thu được ở bước c),
  - i) trong đó alen kiểu dại của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 60% với protein bất kỳ trong số các protein được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO 2 hoặc SEQ ID NO 6 hoặc SEQ ID NO 12 hoặc SEQ ID NO 19 hoặc SEQ ID NO 20.

Tuy nhiên, theo một khía cạnh thứ tự của các bước cũng có thể khác.

Vì vậy, theo một khía cạnh, phương pháp tạo ra thực vật bao gồm các bước:

- a) đưa đột biến vào quần thể thực vật
- b) nhận dạng thực vật mang đột biến ở alen mã hóa gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS và tùy ý
- c) xác định xem liệu thực vật này có hữu thụ đực hay không và liệu thực vật, hoặc thực vật thể hệ con có được tạo ra bằng cách tự thụ tinh hay không, có tạo quả không hạt hay không.

Tùy ý, phương pháp này bao gồm bước chọn lọc thực vật chứa ít nhất một bản sao của alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Alen đột biến, khi ở dạng đồng hợp tử, dẫn đến sự tạo quả không hạt. Thực vật chứa alen này là hữu thụ đực.

Theo một khía cạnh, alen kiểu dại của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất về trình tự ít nhất là 60% với protein bất kỳ trong số các protein được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO 2 hoặc SEQ ID NO 6 hoặc SEQ ID NO 12 hoặc SEQ ID NO 19 hoặc SEQ ID NO 20.

Ngoài ra, bước a) của các phương pháp này (nghĩa là đưa đột biến vào quần thể

thực vật) cũng có thể được bỏ qua trong các phương pháp nêu trên.

“Quần thể thực vật” trong ngữ cảnh của sáng chế này có nghĩa là nhiều hơn một thực vật hoàn chỉnh và cũng bao gồm các phần của thực vật, quả, hạt hoặc tế bào thực vật. Các phần của thực vật, quả, hạt hoặc tế bào thực vật trong mỗi trường hợp có nguồn gốc từ nhiều hơn một thực vật có nghĩa là “quần thể các phần của thực vật, quả, hạt hoặc tế bào thực vật”, các phần của thực vật, quả, hạt hoặc tế bào thực vật này, tương ứng, không thu được từ một thực vật duy nhất mà từ nhiều thực vật.

Các chất hóa học, có thể được sử dụng để tạo ra đột biến gây ra do hóa chất, và các đột biến này là do tác động của các chất sinh đột biến tương ứng, ví dụ như các chất được mô tả trong tài liệu Ehrenberg and Husain, 1981, (Mutation Research 86, 1-113), Müller, 1972 (Biologisches Zentralblatt 91 (1), 31-48). Việc tạo ra thể đột biến của lúa bằng cách sử dụng bức xạ gama, etyl metan sulphonat (EMS), N-metyl-N-nitrosure hoặc natri azit ( $\text{NaN}_3$ ) được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Jauhar và Siddiq (1999, Indian Journal of Genetics, 59 (1), 23-28), trong tài liệu Rao (1977, Cytologica 42, 443-450), Gupta và Sharma (1990, Oryza 27, 217-219) và Satoh and Omura (1981, Japanese Journal of Breeding 31 (3), 316-326). Việc tạo ra các thể đột biến của lúa mỳ bằng cách sử dụng  $\text{NaN}_3$  hoặc maleic hydrazit được mô tả trong Arora et al. (1992, Annals of Biology 8 (1), 65-69). Tổng quan về việc tạo ra thể đột biến lúa mỳ bằng cách sử dụng các loại bức xạ giàu năng lượng khác nhau và các chất hóa học khác nhau được nêu trong tài liệu Scarascia-Mugnozza et al. (1993, Mutation Breeding Review 10, 1-28). Svec và đồng tác giả (1998, Cereal Research Communications 26 (4), 391-396) mô tả việc sử dụng N-etyl-N-nitrosure để tạo ra thể đột biến ở lúa mỳ đen. Sử dụng MMS (axit metyl metan sulphonic) và bức xạ gama để sản xuất thể đột biến của kê được mô tả trong Shashidhara et al. (1990, Journal of Maharashtra Agricultural Universities 15 (1), 20-23).

Việc sản xuất thể đột biến ở các loài thực vật, mà chủ yếu nhân giống sinh dưỡng, đã được mô tả, ví dụ, đối với khoai tây, tạo ra tinh bột được cải biến (Hovenkamp-Hermelink et al. (1987, Theoretical và Applied Genetics 75, 217-221) và đối với bạc hà với sản lượng dầu tăng hoặc chất lượng dầu được biến đổi (Dwivedi et al., 2000, Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22, 460-463).

Tất cả các phương pháp này về cơ bản thích hợp trong phương pháp tạo ra thực vật theo sáng chế để tạo ra các alen đột biến ở các gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Trong phương pháp tạo ra thực vật theo sáng chế tốt hơn là quần thể đột biến được tạo ra bằng cách dùng ethyl metan sulphonat (EMS) cho thực vật hoặc hạt của thực vật để đưa vào các đột biến.

Việc chọn lọc thực vật tạo quả không hạt có thể được thực hiện bằng cách sàng lọc/xác định kiểu hình có thể nhìn thấy được của quả một cách đơn giản. Do kiểu hình không hạt chỉ được nhìn thấy ở các điều kiện đồng hợp tử, bản thân quần thể thực vật được gây đột biến là được ưu tiên trước khi xác định kiểu hình. Hạt phấn hữu thụ được tạo ra bởi thực vật có thể, chẳng hạn, được chỉ ra bằng cách sử dụng phấn từ cây tương ứng để thụ phấn chéo với một cây hữu thụ cái khác. Trong trường hợp hạt từ cây thụ phấn chéo này là có thể sống sót, phấn hoa được sử dụng trong thụ phấn chéo là hữu thụ. Đột biến ở các alen thích hợp, đặc biệt là ở các alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, có thể được phát hiện với sự trợ giúp của các phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực. Đặc biệt là, các phương pháp phân tích dựa trên sự lai hóa với các đoạn dò (Southern Blot), sự khuếch đại bằng các phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), đọc trình tự của các trình tự bộ gen tương ứng và tìm kiếm những thay đổi nucleotit có thể được sử dụng cho mục đích này. Phương pháp nhận biết đột biến dựa trên các mẫu lai hóa, ví dụ như tìm kiếm sự chênh lệch chiều dài đoạn tới hạn (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) (Nam et al., 1989, Tế bào thực vật 1, 699-705; Leister and Dean, 1993, The Plant Journal 4 (4), 745-750). Phương pháp dựa trên PCR, ví dụ như phương pháp phân tích chênh lệch chiều dài đoạn khuếch đại (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) (Castiglioni et al., 1998, Genetics 149, 2039-2056; Meksem et al., 2001, Molecular Genetics and Genomics 265, 207-214; Meyer et al., 1998, Molecular and General Genetics 259, 150-160). Việc sử dụng các đoạn khuếch đại được cắt bởi endonucleaza giới hạn (Cleaved Amplified Polymorphic Các trình tự, CAPS) cũng có thể được sử dụng nhờ việc nhận dạng đột biến (Konieczny and Ausubel, 1993, The Plant Journal 4, 403-410; Jarvis et al., 1994, Plant Molecular Biology 24, 685-687; Bachem et al., 1996, The Plant Journal 9 (5), 745-753). Phương

pháp xác định các SNP đã được mô tả bởi Qi và đồng tác giả (2001, Nucleic acid Research 29 (22), e116) Drenkard et al. (2000, Plant Physiology 124, 1483-1492) và Cho và đồng tác giả (1999, Nature Genetics 23, 203-207) trong số các phương pháp khác. Các phương pháp mà cho phép nghiên cứu sự đột biến ở một số gen nhất định trong một số thực vật trong một thời gian ngắn là đặc biệt thích hợp. Một phương pháp như vậy còn được gọi là TILLING (thương tổn cục bộ được gây hướng đích ở bộ gen - Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) đã được mô tả bởi McCallum và đồng tác giả (2000, Plant Physiology 123, 439-442).

Trước đây đã biết rõ rằng các phương pháp khác hiện nay là hữu hiệu để nhận dạng tế bào thực vật theo sáng chế và thực vật theo sáng chế mang alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Các phương pháp này bao gồm phương pháp được gọi là phương pháp sàng lọc thuận. Trong phương pháp sàng lọc thuận, quần thể đột biến được tạo ra. Thực vật thuộc quần thể đột biến, chẳng hạn thực vật M2 được sàng lọc để thu được thực vật tạo ra quả không hạt, các thực vật này sau đó được lai chéo với các dòng lai gần khác nhau khác để tạo ra quần thể lập bản đồ. Quần thể lập bản đồ sau đó được phân tích bằng các phương pháp đã được biết rõ trước đây để nhận dạng alen gây ra kiểu hình quả không hạt. Các phương pháp khác để nhận biết liệu thực vật hoặc tế bào thực vật có bao gồm alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hay không bao gồm bước đọc trình tự của các alen tương ứng và phân tích marker SNP bằng các phương pháp thông thường trong lĩnh vực và được thảo luận chẳng hạn trong Thomson (2014, Plant Breeding and Biotechnology 2,195-212).

Các phương pháp này về cơ bản thích hợp để nhận dạng tế bào thực vật theo sáng chế và thực vật theo sáng chế mang alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS.

Việc trồng thực vật tạo ra quả không hạt hữu thụ được mang alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS được nhận biết trong phương pháp tạo ra thực vật theo sáng chế có thể được thực hiện bằng các phương pháp thông thường trong nhà kính hoặc trên cánh đồng. Việc canh tác và/hoặc nhân giống của các thực vật này có thể được thực hiện bằng các phương pháp thông thường trong lĩnh vực

chẳng hạn như bằng cách cắt, nuôi cấy mô, tế bào, thể nguyên sinh, phôi hoặc thể sản *in vitro* hoặc vi nhân giống bằng cách cắt ghép với một thân rễ khác.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, phương pháp tạo ra thực vật theo sáng chế được sử dụng để tạo ra thực vật theo sáng chế. Các phương án được ưu tiên được mô tả trên đây đối với thực vật theo sáng chế theo đó có thể được áp dụng cho các phương pháp tạo ra thực vật theo sáng chế.

Thực vật có thể thu được/thu được bằng phương pháp tạo ra thực vật theo sáng chế cũng là một phương án của sáng chế.

Các phương pháp khác sẵn có trong kỹ thuật gen cũng có khả năng tạo ra thực vật mang các alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hoặc mang protein không chức năng tương tự xyclin SDS hoặc có hoạt tính protein tương tự xyclin SDS giảm hoặc có mức độ biểu hiện của protein tương tự xyclin SDS là giảm.

Các phương pháp này dựa trên sự đưa một phân tử axit nucleic ngoại lai hoặc một số phân tử axit nucleic ngoại lai vào bộ gen của tế bào thực vật hoặc thực vật và vì vậy về cơ bản thích hợp để tạo ra tế bào thực vật theo sáng chế và thực vật theo sáng chế.

Vì vậy, một phương án khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra thực vật bao gồm các bước:

- a) đưa một phân tử axit nucleic ngoại lai vào thực vật, trong đó phân tử axit nucleic ngoại lai được chọn từ nhóm gồm:
  - ii) các phân tử ADN, mã hóa ít nhất một ARN đối nghĩa, làm giảm sự biểu hiện của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xyclin SDS;
  - iii) các phân tử ADN, mà nhờ tác dụng ức chế đồng thời dẫn đến giảm sự biểu hiện của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xyclin SDS;
  - iv) các phân tử ADN mã hóa ít nhất một ribozym, mà tách các sản phẩm phiên mã cụ thể của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xyclin SDS;
  - v) các phân tử AND mã hóa đồng thời ít nhất một ARN đối nghĩa và ít nhất một ARN có nghĩa, trong đó ARN đối nghĩa đã nêu và ARN có nghĩa tạo thành một phân tử ARN sợi kép, làm giảm sự biểu hiện của gen nội sinh mã

hóa protein tương tự cyclin SDS (kỹ thuật ARNi);

- vi) các phân tử axit nucleic được đưa vào bằng cách gây đột biến *in vivo*, tạo ra sự đột biến hoặc sự cài xen của một trình tự khác loài ở gen nội sinh mã hóa protein tương tự cyclin SDS, trong đó sự đột biến hoặc sự cài xen làm giảm sự biểu hiện của gen mã hóa protein tương tự cyclin SDS hoặc dẫn đến sự tổng hợp của một protein bất hoạt tương tự cyclin SDS;
  - vii) các phân tử axit nucleic mã hóa một kháng thể, trong đó kháng thể này tạo ra sự giảm hoạt tính của gen nội sinh mã hóa protein tương tự cyclin SDS do việc gắn kết của kháng thể này với protein nội sinh tương tự cyclin SDS,
  - viii) các phân tử ADN chứa các gen nhảy, trong đó sự hợp nhất của các gen nhảy này dẫn đến sự đột biến hoặc sự cài xen trong gen nội sinh mã hóa protein tương tự cyclin SDS, làm giảm sự biểu hiện của gen nội sinh mã hóa protein tương tự cyclin SDS, hoặc dẫn đến sự tổng hợp của một protein bất hoạt tương tự cyclin SDS;
  - ix) các phân tử T-ADN mà do sự cài xen trong gen nội sinh mã hóa protein tương tự cyclin SDS, làm giảm sự biểu hiện của gen nội sinh mã hóa protein tương tự cyclin SDS, hoặc dẫn đến sự tổng hợp của một protein bất hoạt tương tự cyclin SDS, và/hoặc
  - x) các phân tử axit nucleic mã hóa endonucleaza ít phân cắt hoặc endonucleaza ít phân cắt được thiết kế theo yêu cầu tốt hơn là meganucleaza, TALEN hoặc hệ CRISPR/Cas
- b) chọn lọc thực vật tạo quả không hạt, tùy ý
  - c) xác minh xem liệu thực vật được chọn lọc ở bước b) có có hoạt tính protein tương tự cyclin SDS giảm so với thực vật kiểu dại mà không có các phân tử axit nucleic ngoại lai nào được hợp nhất vào trong bộ gen của nó hay không, và tùy ý
  - d) sinh trưởng/trồng thực vật thu được ở bước c).

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đưa một phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật liên quan đến phương pháp tạo ra cây hữu thụ được, có nghĩa là xảy ra việc chọn lọc thực vật hữu thụ

đục và tạo quả không hạt (ở bước b và/hoặc c).

Việc giảm hoạt tính của protein tương tự xyclin SDS ở tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế hoặc trong phương pháp theo sáng chế bao gồm việc đưa một phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật mà có thể được gây ra nhờ sự biểu hiện của các cấu trúc đối nghĩa hoặc ức chế đồng thời.

Để ức chế sự biểu hiện của gen bằng kỹ thuật đối nghĩa hoặc ức chế đồng thời, phân tử ADN có thể được sử dụng, ví dụ, bao gồm toàn bộ trình tự mã hóa cho protein tương tự xyclin SDS, bao gồm các trình tự bọc sườn hiện có bất kỳ, cũng như là các phân tử ADN, mà chỉ bao gồm các phần của trình tự mã hóa, vì vậy các phân này cần phải đủ dài để tạo ra tác dụng đối nghĩa hoặc tác dụng đồng kìm hãm một cách tương ứng trong tế bào. Nói chung, các trình tự có chiều dài tối thiểu lên tới 20 bp hoặc 21 bp (hoặc nucleotit), tốt hơn là chiều dài tối thiểu ít nhất là 100 bp (hoặc nucleotit), đặc biệt tốt hơn là ít nhất là 500 bp (hoặc nucleotit) là thích hợp. Ví dụ, các phân tử ADN có chiều dài 21-100 bp (hoặc nucleotit), tốt hơn là 100-500 bp (hoặc nucleotit), đặc biệt tốt hơn là lớn hơn 500 bp (hoặc nucleotit).

Việc sử dụng các trình tự ADN có mức độ đồng nhất cao với các trình tự nội sinh xuất hiện ở tế bào thực vật và mã hóa protein tương tự xyclin SDS, cũng thích hợp đối với các chế phẩm đối nghĩa hoặc đồng kìm hãm. Mức đồng nhất tối thiểu cần lớn hơn khoảng 65%, tốt hơn là lớn hơn 80%. Việc sử dụng các trình tự với mức đồng nhất ít nhất 90%, đặc biệt là nằm trong khoảng từ 95% đến 100%, là được ưu tiên. Nghĩa của thuật ngữ "mức đồng nhất về trình tự" được định nghĩa ở một nơi khác trong bản mô tả này.

Ngoài ra, việc sử dụng các intron, nghĩa là các vùng không mã hóa của gen, mà mã hóa cho protein tương tự xyclin SDS, cũng có thể nhận thức được để đạt được tác dụng đối nghĩa hoặc đồng kìm hãm. Việc sử dụng các trình tự intron để ức chế sự biểu hiện gen của các gen, mà nó mã hóa cho các protein sinh tổng hợp tinh bột, đã được mô tả chẳng hạn trong các đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế quốc tế WO97/04112, WO97/04113, WO98/37213, WO98/37214.

Chuyên gia trong lĩnh vực biết cách đạt được tác dụng đối nghĩa và đồng kìm

hãm. Ví dụ, phương pháp đồng kìm hãm sự ức chế đã được mô tả trong Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui and Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

Sự biểu hiện của ribozym để giảm hoạt tính của các enzym cụ thể ở các tế bào cũng đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực, và được mô tả, ví dụ, trong EP-B1 0321201. Sự biểu hiện của ribozym ở tế bào thực vật đã được mô tả, ví dụ, trong Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250, (1996), 329-338).

Sự giảm hoạt tính của protein tương tự xyclin SDS ở tế bào thực vật hoặc thực vật theo sáng chế hoặc trong phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đưa phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật cũng có thể được gây ra bằng cách biểu hiện đồng thời các phân tử ARN có nghĩa và đối nghĩa (công nghệ ARNi) của gen đích tương ứng cần bị ức chế, tốt hơn là của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS.

Điều này có thể đạt được, ví dụ, bằng cách sử dụng các cấu trúc khảm, chứa "các đoạn lặp đảo" của gen đích tương ứng hoặc các phần của gen đích. Trong trường hợp này, các cấu trúc di truyền này mã hóa cho các phân tử ARN có nghĩa và đối nghĩa của gen đích tương ứng. ARN có nghĩa và đối nghĩa được tổng hợp đồng thời *in planta* như một phân tử ARN, trong đó các ARN có nghĩa và đối nghĩa được ngăn cách với nhau bằng một đoạn đệm, và có khả năng tạo thành một phân tử ARN sợi kép.

Đã chỉ ra rằng việc đưa một cấu trúc ADN lặp đảo vào bộ gen của tế bào thực vật hoặc thực vật là một phương pháp ức chế gen rất hiệu quả tương ứng với các cấu trúc ADN lặp đảo (Waterhouse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, (1998), 13959-13964; Wang and Waterhouse, Plant Mol. Biol. 43, (2000), 67-82; Singh et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 925- 927; Liu et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 927-929); Smith et al., (Nature 407, (2000), 319-320; international patent application WO99/53050 A1).

Trình tự có nghĩa và trình tự đối nghĩa của gen đích hoặc của các gen đích cũng có thể được biểu hiện một cách riêng biệt với nhau bằng các trình tự khởi đầu giống hoặc khác nhau (Nap, J-P et al, 6<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, Quebec, 18th-24th June, 2000; Poster S7-27, Presentation Session S7). Vì vậy, việc làm giảm hoạt tính của protein tương tự xyclin SDS trong tế bào thực vật theo sáng chế hoặc thực vật theo sáng chế cũng có thể đạt được bằng cách tạo ra các phân tử ARN sợi kép. Liên quan đến vấn đề này, "đoạn lặp đảo" của các phân tử ADN của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hoặc các cADN tốt hơn là được đưa vào bộ gen thực vật, trong đó các phân tử ADN (gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hoặc cADN hoặc các đoạn của các gen hoặc các cADN này) cần phiên mã chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu, mà kiểm soát sự biểu hiện của các phân tử ADN này.

Vì vậy, các đoạn của các phân tử axit nucleic mã hóa protein tương tự xyclin SDS bất kỳ cũng là một khía cạnh của sáng chế. Các đoạn như vậy có các ứng dụng khác nhau, chẳng hạn làm các đoạn mồi hoặc các đầu dò, hoặc chúng có thể được kết hợp vào các vector biến nạp và được sử dụng để tạo ra thực vật tạo quả không hạt.

Các đoạn như vậy của các phân tử axit nucleic mã hóa protein tương tự xyclin SDS có thể có kích thước khác nhau, chẳng hạn ít nhất 10 nucleotit, ít nhất 20, ít nhất 30, ít nhất 40, ít nhất 50, ít nhất 60, ít nhất 70, ít nhất 80, ít nhất 90, ít nhất 100, ít nhất 200, ít nhất 300, ít nhất 400, ít nhất 500 nucleotit hoặc nhiều hơn.

Ngoài ra, đã biết rằng sự tạo thành các phân tử ARN sợi kép từ các phân tử ADN khởi đầu ở thực vật *in trans* có thể dẫn đến sự methyl hóa và sự bất hoạt quá trình phiên mã của các bản sao tương đồng của các trình tự khởi đầu này, mà nó được đề cập đến trong phần đây như là các trình tự khởi đầu đích (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). Vì vậy, có thể làm giảm sự biểu hiện gen của một gen đích cụ thể (chẳng hạn gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS), một cách tự nhiên dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu đích này, bằng cách khử hoạt tính của trình tự khởi đầu đích. Điều này có nghĩa là, trong trường hợp này, các phân tử ADN, mà bao gồm các trình tự khởi đầu đích của các gen cần ức chế (gen đích), trái với chức năng ban đầu của trình tự khởi đầu ở thực vật, không được sử dụng làm yếu tố kiểm soát sự biểu hiện của các gen hoặc các cADN, mà bản thân chúng được sử dụng làm các phân tử

ADN có khả năng phiên mã.

Để tạo ra các phân tử ARN khởi đầu đích sợi kép *in planta*, mà ở đây có thể xuất hiện như các phân tử cặp tóc ARN, tốt hơn là các cấu trúc chứa "đoạn lặp đảo" của các phân tử AND khởi đầu đích được sử dụng, trong đó các phân tử ADN khởi đầu đích này chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu, mà kiểm soát sự biểu hiện gen của các phân tử ADN khởi đầu đích này. Các cấu trúc này sau đó được đưa vào bộ gen của thực vật. Sự biểu hiện của "đoạn lặp đảo" của các phân tử ADN khởi đầu đích đã nêu *in planta* dẫn đến sự tạo thành các phân tử ARN khởi đầu đích sợi kép (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). Trình tự khởi đầu đích có thể bị bất hoạt bằng các cách này. Vì vậy, việc làm giảm hoạt tính của protein tương tự xyclin SDS ở tế bào thực vật theo sáng chế và thực vật theo sáng chế cũng có thể đạt được bằng cách đưa các phân tử ARN sợi kép của trình tự khởi đầu của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS vào tế bào thực vật hoặc thực vật. Liên quan đến vấn đề này, "đoạn lặp đảo" của các phân tử ADN khởi đầu của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS tốt hơn là được đưa vào bộ gen của thực vật, trong đó các phân tử ADN khởi đầu đích (trình tự khởi đầu của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS) được phiên mã dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu, mà kiểm soát sự biểu hiện của các phân tử ADN khởi đầu đích này.

Để ức chế sự biểu hiện của các gen bằng cách biểu hiện đồng thời các phân tử ARN có nghĩa và đối nghĩa (công nghệ ARNi), phân tử ADN có thể được sử dụng, ví dụ, bao gồm toàn bộ trình tự mã hóa cho protein tương tự xyclin SDS, bao gồm các trình tự bọc sườn bất kỳ hiện có, cũng như các phân tử ADN, bao gồm chỉ các phần của trình tự mã hóa, nhờ đó các phần này phải đủ dài để tạo ra tác dụng ARNi trong tế bào. Các phần của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có thể được chọn từ trình tự mã hóa, các trình tự không được mã hóa xuôi chiều hoặc ngược chiều, các intron, các trình tự khởi đầu và/hoặc trình tự tăng cường. Nói chung, các trình tự với chiều dài tối thiểu 20 bp (hoặc nucleotit), tốt hơn là chiều dài tối thiểu ít nhất 25 bp (hoặc nucleotit), đặc biệt tốt hơn là ít nhất 50 bp (hoặc nucleotit) là thích hợp. Ví dụ, các phân tử ADN có chiều dài từ 20 đến 25 bp (hoặc nucleotit), tốt hơn là từ 26 đến 50 bp (hoặc nucleotit), đặc biệt tốt hơn là lớn hơn 50 bp (hoặc nucleotit).

Việc sử dụng trình tự ADN, có mức độ đồng nhất cao với các trình tự nội sinh xuất hiện ở tế bào thực vật và mã hóa protein tương tự xylin SDS, cũng thích hợp để biểu hiện đồng thời các phân tử ARN có nghĩa và đối nghĩa (công nghệ ARNi). Mức đồng nhất tối thiểu cần lớn hơn khoảng 65%, tốt hơn là lớn hơn 80%. Việc sử dụng các trình tự với mức đồng nhất ít nhất 90%, đặc biệt là nằm trong khoảng từ 95% đến 100%, được đặc biệt ưu tiên. Các trình tự, chứa các đoạn duỗi liên tiếp của các trình tự axit nucleic được bao hàm bởi trình tự axit nucleic như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1, là đặc biệt thích hợp để ức chế gen mã hóa protein tương tự xylin SDS bằng công nghệ ARNi.

Việc làm giảm hoạt tính của protein tương tự xylin SDS ở tế bào thực vật theo sáng chế và thực vật theo sáng chế hoặc trong phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đưa phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật có thể đạt được bằng phương pháp còn được gọi là "sinh đột biến *in vivo*", trong đó oligonucleotit lai ARN-ADN ("Chimeroplast") được đưa vào tế bào thực vật (Kipp, P.B. et al., Poster Session at the "5<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, 21st-27th September 1997, Singapore; R. A. Dixon and C.J. Arntzen, meeting report on "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; Công bố đơn sáng chế quốc tế WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et al., 1999, PNAS 96, 8774-8778).

Một phần của thành phần ADN của oligonucleotit ARN-ADN là tương đồng với trình tự axit nucleic của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xylin SDS, nhưng so với trình tự axit nucleic của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xylin SDS, nó có sự đột biến hoặc chứa vùng khác loại, được bao quanh bởi các vùng tương đồng. Bằng cách cặp đôi bazơ của các vùng tương đồng của oligonucleotit ARN-ADN và phân tử axit nucleic nội sinh sau đó tái tổ hợp tương đồng, vùng đột biến hoặc vùng khác loại được chứa trong các thành phần ADN của oligonucleotit ARN-ADN có thể được chuyển vào bộ gen của tế bào thực vật. Điều này dẫn đến làm giảm hoạt tính của một hoặc nhiều protein tương tự xylin SDS.

Việc giảm hoạt tính của protein tương tự xylin SDS ở tế bào thực vật theo

sáng chế và thực vật theo sáng chế hoặc trong phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đưa phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật có thể đạt được bằng cách đưa các phân tử axit nucleic mã hóa các chất đối kháng/các chất ức chế của protein tương tự xyclin SDS vào tế bào thực vật. Chuyên gia trong lĩnh vực biết rằng có thể làm giảm hoạt tính của protein tương tự xyclin SDS nhờ sự biểu hiện của dẫn xuất không chức năng, đặc biệt là đột biến trội trans, của các protein này, và/hoặc bởi sự biểu hiện của các chất đối kháng/các chất ức chế của các protein này. Các chất đối kháng/các chất ức chế của các protein như vậy bao gồm, ví dụ, các kháng thể, các đoạn kháng thể hoặc các phân tử có đặc tính gắn kết tương tự. Ví dụ, kháng thể scFv có trong bào chất đã được sử dụng để điều biến hoạt tính của protein phytochrome A trong cây thuốc lá biến đổi gen (Owen, *Bio/Technology* 10 (1992), 790-4; Review: Franken, E, Teuschel, U. and Hain, R., *Current Opinion in Biotechnology* 8, (1997), 411-416; Whitelam, *Trends Plant Sci.* 1 (1996), 268-272; Conrad and Manteufel, *Trends in Plant Science* 6, (2001), 399-402; De Jaeger et al., *Plant Molecular Biology* 43, (2000), 419-428). Việc làm giảm hoạt tính của enzym phân nhánh ở cây khoai tây bằng cách biểu hiện kháng thể đặc hiệu đã được mô tả bởi Jobling và đồng tác giả (*Nature Biotechnology* 21, (2003), 77-80). Trong tài liệu này, kháng thể được đề xuất với trình tự đích thể hạt sao cho đảm bảo sự ức chế protein được định vị ở các thể hạt.

Việc giảm hoạt tính của protein tương tự xyclin SDS ở tế bào thực vật theo sáng chế và thực vật theo sáng chế hoặc trong phương pháp theo sáng chế bao gồm việc đưa phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật có thể đạt được bằng cách đưa các phân tử axit nucleic chứa các trình tự gen nhảy vào tế bào thực vật. Sự cài xen các trình tự gen nhảy vào trình tự của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xyclin SDS, sẽ gây ra sự giảm biểu hiện của protein nội sinh tương tự xyclin SDS.

Các gen nhảy có thể là các gen nhảy nội sinh (cùng loài đối với thực vật) và cũng có thể là các gen nhảy mà không xuất hiện một cách tự nhiên trong tế bào này (khác loài đối với thực vật) nhưng trong mỗi trường hợp đều được đưa vào thực vật hoặc tế bào thực vật bằng các phương pháp kỹ thuật di truyền, ví dụ như biến nạp tế bào. Việc thay đổi sự biểu hiện của các gen bằng các gen nhảy là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực. Tổng quan việc sử dụng các gen nhảy nội sinh và khác loài

làm công cụ trong công nghệ sinh học thực vật được thể hiện trong tài liệu của Ramachandran và Sundaresan (2001, *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 234-252). Khả năng nhận biết các đột biến trong đó các gen đặc hiệu được làm bất hoạt bằng các phương pháp sinh đột biến nhờ cài xen gen nhảy được mô tả trong phần tổng quan bởi Maes và đồng tác giả (1999, *Trends in Plant Science* 4 (3), 90-96). Việc tạo ra thể đột biến của lúa với sự giúp đỡ của các gen nhảy nội sinh được mô tả bởi Hirochika (2001, *Current Opinion in Plant Biology* 4, 118-122). Việc nhận dạng các gen ở ngô với sự trợ giúp của các retrotransposon nội sinh được nêu, ví dụ bởi Hanley và đồng tác giả (2000, *The Plant Journal* 22 (4), 557-566). Khả năng sản xuất thể đột biến với sự trợ giúp của các retrotransposon và các phương pháp nhận biết các thể đột biến được mô tả bởi Kumar và Hirochika (2001, *Trends in Plant Science* 6 (3), 127-134). Hoạt tính của các gen nhảy công nghệ (nhân tạo) ở các loài khác nhau đã được mô tả đối với cả thực vật hai lá mầm và thực vật một lá mầm: chẳng hạn đối với lúa (Greco et al., 2001, *Plant Physiology* 125, 1175-1177; Liu et al., 1999, *Molecular and General Genetics* 262, 413-420; Hiroyuki et al., 1999, *The Plant Journal* 19 (5), 605-613; Jeon und Gynheung, 2001, *Plant Science* 161, 211-219), lúa mạch (2000, Koprek et al., *The Plant Journal* 24 (2), 253-263), *Arabidopsis thaliana* (Aarts et al., 1993, *Nature* 363, 715-717, Schmidt und Willmitzer, 1989, *Molecular and General Genetics* 220, 17-24; Altmann et al., 1992, *Theoretical and Applied Genetics* 84, 371-383; Tissier et al., 1999, *The Plant Cell* 11, 1841-1852), cà chua (Belzile und Yoder, 1992, *The Plant Journal* 2 (2), 173-179) và khoai tây (Frey et al., 1989, *Molecular and General Genetics* 217, 172-177; Knapp et al., 1988, *Molecular and General Genetics* 213, 285-290).

Nhìn chung, tế bào thực vật theo sáng chế và thực vật theo sáng chế có thể được sản xuất với sự trợ giúp đồng thời của cả các gen nhảy cùng loài và khác loài.

Đối với sáng chế này, tế bào thực vật và thực vật theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp sinh đột biến còn được gọi là sinh đột biến bằng cài xen (bài báo tổng quan: Thorneycroft et al., 2001, *Journal of experimental Botany* 52 (361), 1593-1601). Việc giảm hoạt tính của protein tương tự xylin SDS ở tế bào thực vật theo sáng chế và thực vật theo sáng chế hoặc trong

phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đưa phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật có thể đạt được bằng cách đưa các phân tử axit nucleic chứa các trình tự T-ADN vào tế bào thực vật.

Phương pháp sinh đột biến bằng cài xen T-ADN dựa trên thực tế là một số phần (T-ADN) của plasmid Ti từ *Agrobacterium* có thể hợp nhất vào bộ gen của tế bào thực vật. Vị trí hợp nhất trong nhiễm sắc thể thực vật không được xác định, nhưng có thể xảy ra ở điểm bất kỳ. Nếu T-ADN hợp nhất vào một phần của nhiễm sắc thể, nó cấu thành chức năng gen, sau đó có thể dẫn đến sự thay đổi về sự biểu hiện gen và vì vậy cũng dẫn đến sự thay đổi về hoạt tính của protein được mã hóa bởi gen quan tâm. Đặc biệt là, sự hợp nhất của T-ADN vào vùng mã hóa của protein thường dẫn đến protein tương ứng không thể được tổng hợp nữa, hoặc không thể được tổng hợp ở dạng có hoạt tính nữa, bởi tế bào đã nêu. Việc sử dụng sự cài xen T-ADN để tạo ra các thể đột biến được mô tả, ví dụ, đối với *Arabidopsis thaliana* (Krysan et al., 1999, Tế bào thực vật 11, 2283-2290; Atipiroz-Leehan and Feldmann, 1997, Trends in genetics 13 (4), 152-156; Parinov and Sundaresan, 2000, Current Opinion in Biotechnology 11, 157-161) và lúa (Jeon and An, 2001, Plant Science 161, 211-219; Jeon et al., 2000, The Plant Journal 22 (6), 561-570). Phương pháp để nhận dạng thể đột biến, mà đã được tạo ra với sự trợ giúp của phương pháp sinh đột biến bằng cài xen T-ADN, đã được mô tả, trong số các tài liệu khác, bởi Young et al., (2001, Plant Physiology 125, 513-518), Parinov et al. (1999, The Plant Cell 11, 2263-2270), Thorneycroft et al. (2001, Journal of Experimental Botany 52, 1593-1601), và McKinney et al. (1995, The Plant Journal 8 (4), 613-622).

Thể đột biến cài xen T-ADN đã được tạo ra ở một số lượng lớn *Arabidopsis thaliana*, ví dụ, và sẵn có bởi các bộ sưu tập chủng giống khác nhau ("Stock centre", e.g. Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, <http://signal.salk.edu/>).

Phương pháp sinh đột biến T-ADN thường thích hợp để tạo ra tế bào thực vật và thực vật theo sáng chế, mà có hoạt tính protein tương tự xylin SDS giảm.

Trong sáng chế này, thuật ngữ "phân tử axit nucleic ngoại lai" được hiểu có

nghĩa là phân tử axit nucleic mà không xuất hiện một cách tự nhiên trong tế bào thực vật kiểu đại tương ứng hoặc thực vật, hoặc là phân tử axit nucleic không xuất hiện một cách tự nhiên với bố trí không gian cụ thể trong tế bào thực vật hoặc thực vật kiểu đại, hoặc phân tử axit nucleic mà nằm ở vị trí trên bộ gen của tế bào thực vật hoặc thực vật này mà ở đó nó không xuất hiện trong tự nhiên. Tốt hơn là, phân tử axit nucleic ngoại lai là phân tử tái tổ hợp, bao gồm các yếu tố khác nhau, tổ hợp hoặc bố trí không gian cụ thể của chúng không xuất hiện một cách tự nhiên trong tế bào thực vật hoặc thực vật.

Nói chung, phân tử axit nucleic ngoại lai có thể là phân tử axit nucleic bất kỳ mà gây ra sự giảm hoạt tính của protein tương tự xylin SDS. Loại phân tử axit nucleic như vậy đã được mô tả trên đây trong bản mô tả này.

Trong sáng chế này, thuật ngữ "bộ gen" cần được hiểu có nghĩa là toàn bộ vật liệu di truyền có mặt ở tế bào thực vật. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã biết rằng, cũng như nhân tế bào, các ngăn khác (chẳng hạn thể hạt, ty thể) cũng chứa vật liệu di truyền.

Nhiều kỹ thuật là sẵn có để đưa ADN vào tế bào chủ thực vật. Các kỹ thuật này bao gồm biến nạp tế bào thực vật với T-ADN bằng cách sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* hoặc *Agrobacterium rhizogenes* làm trung gian biến nạp, dung hợp các thể nguyên sinh, tiêm axit nucleic, điện di axit nucleic, đưa axit nucleic vào bằng các phương pháp súng bắn gen cũng như các phương pháp có thể có khác.

Việc sử dụng phương pháp biến nạp tế bào thực vật qua trung gian agrobacteria đã được nghiên cứu rộng khắp và được mô tả một cách thích đáng trong EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 và bởi An và đồng tác giả trong EMBO J. 4, (1985), 277-287. Để biến nạp khoai tây, xem tài liệu: Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33, ví dụ.

Việc biến nạp thực vật một lá mầm bằng các vector dựa trên sự biến nạp *Agrobacterium* cũng đã được mô tả (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science in China 33, (1990), 28-34;

Wilmink et al., *Plant Cell Reports* 11, (1992), 76-80; May et al., *Bio/Technology* 13, (1995), 486-492; Conner và Domisse, *Int. J. Plant Sci.* 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, *Transgenic Res.* 2, (1993), 252-265). Một hệ thống khác để biến nạp thực vật một lá mầm là hệ biến nạp theo phương pháp súng bắn gen (Wan and Lemaux, *Plant Physiol.* 104, (1994), 37-48; Vasil et al., *Bio/Technology* 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., *Plant Mol. Biol.* 24, (1994), 317-325; Spencer et al., *Theor. Appl. Genet.* 79, (1990), 625-631), biến nạp thể nguyên sinh, điện di các tế bào có thể thấm qua một phần và đưa ADN vào bằng sợi thủy tinh. Đặc biệt là, biến nạp ngô đã được mô tả nhiều lần trong tài liệu này (xem WO95/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm et al., *Biotechnology* 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* 2, (1990), 603-618; Koziel et al., *Biotechnology* 11 (1993), 194-200; Moroc et al., *Theor. Appl. Genet.* 80, (1990), 721-726 chẳng hạn). Việc biến nạp thành công các loại ngũ cốc khác cũng đã được mô tả, ví dụ đối với lúa mạch (Wan and Lemaux, xem trên đây; Ritala et al., xem trên đây; Krens et al., *Nature* 296, (1982), 72-74) và đối với lúa mỳ (Nehra et al., *Plant J.* 5, (1994), 285-297; Becker et al., 1994, *Plant Journal* 5, 299-307). Tất cả các phương pháp trên đây là thích hợp trong khuôn khổ của sáng chế này. Việc biến nạp các cây trồng là rau cũng thường đã biết trước đây. Trong tài liệu Curtis (2012, Springer Science & Business Media, ISBN: 1402023332, 9781402023330) bên cạnh các phương pháp khác, phương pháp biến nạp cà phê, dưa, lê, củ cải, cà rốt, đậu, cải bắp, súp lơ và dưa hấu được bộc lộ. Việc biến nạp các cây trồng là rau như chuối, chanh, xoài, đu đủ, dưa hấu, bơ, nho, dưa (ngọt), quả kiwi, cà phê, cacao đã được mô tả trong tài liệu: Pua and Davey (2007, Springer Science & Business Media, ISBN: 3540491619, 9783540491613).

Để biểu hiện các phân tử axit nucleic, như các phân tử axit nucleic có tác dụng gây câm gen hoặc được sử dụng để đưa các đột biến vào alen trong tế bào thực vật hoặc thực vật, các axit nucleic này tốt hơn là được liên kết với các trình tự điều hòa ADN, bao gồm các trình tự mà khởi đầu phiên mã ở tế bào thực vật (trình tự khởi đầu). Đồng thời, trình tự khởi đầu này có thể được chọn sao cho sự biểu hiện xảy ra chủ yếu hoặc chỉ xảy ra ở một mô nhất định, ở một giai đoạn nhất định của quá trình phát triển của thực vật hoặc ở một thời điểm được xác định bởi ảnh hưởng ngoại cảnh.

Trình tự khởi đầu có thể cùng loài hoặc khác loài đối với thực vật và đối với phân tử axit nucleic. Vì vậy các phân tử axit nucleic này thường không xuất hiện trong tự nhiên ở thực vật nhưng là các phân tử axit nucleic tái tổ hợp, có nghĩa là sự tổ hợp của các yếu tố di truyền khác nhau (chẳng hạn các trình tự mã hóa, trình tự hỗ trợ ARNi, trình tự khởi đầu) chứa trong phân tử axit nucleic không có mặt trong tổ hợp này trong tự nhiên.

Các trình tự khởi đầu thích hợp thường đã biết trước đây, ví dụ, trình tự khởi đầu của ARN 35S của virus khảm ở súp lơ và trình tự khởi đầu ubiquitin từ ngô để biểu hiện cơ định, trình tự khởi đầu patatin B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) để biểu hiện đặc hiệu củ ở khoai tây hoặc trình tự khởi đầu, mà chỉ đảm bảo sự biểu hiện ở mô có hoạt tính quang hợp, chẳng hạn trình tự khởi đầu ST-LS1 (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) hoặc, để biểu hiện đặc hiệu nội nhũ của trình tự khởi đầu HMG từ lúa mỳ, trình tự khởi đầu USP, trình tự khởi đầu phaseolin, trình tự khởi đầu của gen zein từ ngô (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93), trình tự khởi đầu glutelin (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4 (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383 (1996), 213-218) hoặc trình tự khởi đầu shrunken-1 (Werr et al., EMBO J. 4 (1985), 1373-1380). Tuy nhiên, các trình tự khởi đầu mà chỉ được hoạt hóa ở thời điểm được xác định bởi các ảnh hưởng ngoại cảnh (xem WO 9307279 chẳng hạn) cũng có thể được sử dụng. Trình tự khởi đầu của các protein sốc nhiệt, cho phép cảm ứng đơn giản, có thể được đặc biệt quan tâm ở đây. Ngoài ra, trình tự khởi đầu đặc hiệu hạt có thể được sử dụng, như trình tự khởi đầu USP từ *Vicia faba*, mà đảm bảo sự biểu hiện đặc hiệu hạt ở *Vicia faba* và các thực vật khác (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467).

Phân tử axit nucleic tái tổ hợp cũng có thể chứa trình tự kết thúc (dấu hiệu polyadenyl hóa), mà được sử dụng để bổ sung đuôi poly-A vào sản phẩm phiên mã. Chức năng ổn định sản phẩm phiên mã được quy cho đuôi poly-A. Các yếu tố thuộc loại này được mô tả trong tài liệu (xem Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) và có

thể thay đổi theo ý muốn.

Các trình tự intron cũng có thể có mặt, chẳng hạn giữa trình tự khởi đầu và vùng mã hóa. Các trình tự intron như vậy có thể dẫn đến sự biểu hiện ổn định và sự biểu hiện gia tăng ở thực vật (Callis et al., 1987, *Genes Devel.* 1, 1183-1200; Luehrsen, and Walbot, 1991, *Mol. Gen. Genet.* 225, 81-93; Rethmeier, et al., 1997; *Plant Journal.* 12(4): 895-899; Rose and Beliakoff, 2000, *Plant Physiol.* 122 (2), 535–542; Vasil et al., 1989, *Plant Physiol.* 91, 1575-1579; XU et al., 2003, *Science in China Series C Vol.46 No.6*, 561-569). Các trình tự intron thích hợp là, ví dụ, intron đầu tiên của gen *sh1* từ ngô, intron đầu tiên của gen polyubiquitin 1 từ ngô, intron đầu tiên của gen *epsps* từ lúa hoặc một trong số hai intron đầu tiên của gen PAT1 từ *Arabidopsis*.

Những điều đã được mô tả ở đây liên quan đến bằng chứng liệu một thực vật có sự đột biến trong trình tự axit nucleic hoặc gen hoặc alen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hay không, đối với việc sinh trưởng/trồng thực vật đối với phương pháp tạo ra thực vật theo sáng chế cũng có thể áp dụng ở đây cho phương pháp bao gồm bước đưa một phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật theo sáng chế.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, các phương pháp tạo ra thực vật theo sáng chế và phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đưa một phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật còn bao gồm một bước nữa bao gồm việc tạo ra một thực vật khác nữa từ thực vật thu được từ bước d) trong mỗi phương pháp theo sáng chế. Thực vật khác nữa được tạo ra này được đặc trưng ở chỗ chúng chứa ít nhất một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hoặc ở chỗ chúng có hoạt tính protein tương tự xyclin SDS giảm do việc đưa vào một phân tử axit nucleic ngoại lai như đã được mô tả trên đây. Các thực vật này có thể được tạo ra bằng cách sinh sản sinh dưỡng (vô tính) hoặc sinh sản tái sinh (hữu tính, giới tính). Các đoạn cắt, mô *in vitro*, tế bào, thể nguyên sinh, phôi hoặc dịch nuôi cấy mô sẹo, vi nhân giống, thân rễ hoặc củ. Các vật liệu nhân giống khác bao gồm, ví dụ, quả, hạt, cây giống con, dị hợp tử hoặc đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDSs, v.v..

Các kỹ thuật để nhân giống sinh dưỡng (vô tính), bao gồm vi nhân giống thực vật đã được biết rõ trước đây và được mô tả đối với chuối, chanh, xoài, đu đủ, bơ, dưa (ngọt), đã được mô tả trong tài liệu: Pua and Davey (2007, Springer Science & Business Media, ISBN: 3540491619, 9783540491613) chẳng hạn. Ví dụ, Sultana và Rhaman (2012, LAP Lambert Academic Publishing, ISBN-13: 978-3-8484-3937-9) bộc lộ các phương pháp nuôi cấy mô khác nhau và phương pháp vi nhân giống đối với dưa hấu.

Thực vật có thể thu được/thu được bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đưa phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật, cũng là một phương án của sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để nhân giống thực vật tạo ra quả không hạt bao gồm các bước:

- a) thu nhận hạt mà từ đó thực vật theo sáng chế sinh trưởng hoặc thu nhận hạt được nộp lưu dưới số lưu giữ NCIMB 42532 hoặc thế hệ con của nó,
- b) cho hạt thu được ở bước a) sinh trưởng thành thực vật,
- c) chọn lọc thực vật tạo ra quả không hạt từ những thực vật được sinh trưởng ở bước b),
- d) nhân giống thực vật được chọn lọc ở bước c) bằng phương pháp được chọn từ nhóm gồm:
  - i) ghép các phần của thực vật được chọn lọc ở bước c) vào một thân rễ khác,
  - ii) nuôi cấy các phần của thực vật được chọn lọc ở bước c) trong dịch nuôi cấy mô *in vitro* và tùy ý tái sinh thực vật mới từ dịch nuôi cấy mô,
  - iii) tùy ý tạo dịch nuôi cấy phôi hoặc thể sần từ các phần của thực vật được chọn lọc ở bước c) và tùy ý tái sinh thực vật mới từ dịch nuôi cấy mô,
  - iv) tùy ý tạo ra các thực vật khác bằng các kỹ thuật vi nhân giống.

Việc nhân giống các phần của thực vật bằng cách ghép và nhân giống và tùy ý tái sinh thực vật bằng các phương pháp nuôi cấy mô đã được biết rõ trước đây. Các phương pháp như vậy đã được mô tả trong các công bố khoa học khác nhau và được xem xét và tóm lược trong một số sách khoa học, chẳng hạn như Smith (2012,

Academic Press, ISBN-13: 978-0124159204), Gayatri & Kavyashree (2015, Alpha Science International Ltd, ISBN-13: 978-1842659618) v.v.. Đối với dưa hấu, các phương pháp tương ứng được mô tả bởi Sultana và Rhaman (2012, LAP Lambert Academic Publishing, ISBN-13: 978-3848439379) chẳng hạn.

Thực vật hoặc các phần của thực vật có thể thu được/thu được bằng các phương pháp nhân giống thực vật tạo ra quả không hạt theo sáng chế cũng là một phương án của sáng chế.

Theo một phương án khác của sáng chế, tất cả các phương pháp tạo ra thực vật theo sáng chế hoặc tùy ý các phương pháp nhân giống thực vật tạo ra quả không hạt theo sáng chế được bộc lộ trong bản mô tả này được sử dụng để tạo ra thực vật theo sáng chế.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến vật liệu nhân giống của thực vật theo sáng chế, và/hoặc vật liệu nhân giống của thực vật chứa tế bào thực vật theo sáng chế hoặc vật liệu nhân giống của thực vật có thể thu được/thu được bằng phương pháp theo sáng chế mà tạo ra thực vật hoặc vật liệu nhân giống của thực vật có thể thu được/thu được bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đưa phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật hoặc vật liệu nhân giống của thực vật có thể thu được/thu được từ thực vật tùy ý có thể thu được bằng phương pháp nhân giống thực vật tạo ra quả không hạt theo sáng chế. Một phương án đặc biệt được bao hàm của sáng chế là vật liệu nhân giống của thực vật có thể thu được/thu được từ hạt được nộp lưu dưới số nộp lưu NCIMB 42532, tốt hơn là vật liệu nhân giống của thực vật có thể thu được/thu được từ hạt được nộp lưu dưới số truy cập NCIMB 42532 dị hợp tử hoặc đồng hợp tử đối với thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Vật liệu nhân giống của thực vật dị hợp tử hoặc đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, trong đó vật liệu nhân giống này thu được/có thể thu được từ thực vật có nguồn gốc từ quá trình lai chéo của một thực vật thu được từ hạt có số nộp lưu NCIMB 42532 với một thực vật khác cũng được bao hàm trong sáng chế.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vật liệu nhân giống” bao gồm các thành phần

của thực vật mà thích hợp để nhân giống thể hệ con nhờ sinh sản sinh dưỡng (vô tính) hoặc sinh sản thể hệ (hữu tính, giới tính). Thích hợp để sinh sản sinh dưỡng là, ví dụ, các đoạn cắt, mô *in vitro*, tế bào, thể nguyên sinh, dịch nuôi cấy phôi hoặc thể sần, các phương pháp vi nhân giống, thân rễ hoặc củ. Các vật liệu nhân giống khác bao gồm, ví dụ, quả, hạt, cây giống con, dị hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS v.v.. Theo một khía cạnh, vật liệu nhân giống ở dạng đoạn cắt được nhân giống, chẳng hạn bằng cách ghép vào một thân rễ khác, hoặc vật liệu nuôi cấy mô *in vitro*, đặc biệt là dịch nuôi cấy phôi. Đặc biệt được ưu tiên là vật liệu nhân giống ở dạng vật liệu nuôi cấy mô *in vitro*, cụ thể là dịch nuôi cấy phôi *in vitro*. Thực vật được tạo ra bằng sinh sản sinh dưỡng trong bản mô tả này còn được đề cập đến như là thực vật được nhân giống sinh dưỡng. Đặc biệt là, thực vật trong đó alen đột biến tương tự xyclin SDS có mặt ở dạng đồng hợp tử tốt hơn là được nhân giống sinh dưỡng (do quả của chúng không có hạt).

Một phương án nữa của sáng chế đề cập đến các phần của thực vật theo sáng chế, và/hoặc các phần của thực vật chứa tế bào thực vật theo sáng chế hoặc các phần của thực vật có thể thu được/thu được bằng phương pháp theo sáng chế tạo ra thực vật hoặc các phần của thực vật có thể thu được/thu được bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đưa phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật hoặc các phần của thực vật có thể thu được/thu được từ thực vật tùy ý có thể thu được bằng phương pháp nhân giống thực vật tạo ra quả không hạt theo sáng chế. Một phương án được bao hàm khác của sáng chế đề cập đến các phần của thực vật có thể thu được/thu được từ hạt được nộp lưu dưới số truy cập NCIMB 42532 (hoặc từ thể hệ con của nó), tốt hơn là các phần của thực vật hoặc thực vật có thể thu được/thu được từ hạt được nộp lưu dưới số truy cập NCIMB 42532 (hoặc từ thể hệ con của nó) dị hợp tử hoặc đồng hợp tử đối với thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Các phần của thực vật của thực vật dị hợp tử hoặc đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, trong đó các phần của thực vật thu được/có thể thu được từ thực vật có nguồn gốc từ việc lai chéo một thực vật thu được từ hạt có số nộp lưu NCIMB 42532 với một thực vật khác.

Một phương án khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra quả

không hạt bao gồm bước cho thực vật theo sáng chế sinh trưởng và/hoặc cho thực vật chứa tế bào thực vật theo sáng chế sinh trưởng hoặc cho thực vật có thể thu được/thu được bằng phương pháp tạo ra thực vật theo sáng chế sinh trưởng hoặc cho quả của thực vật có thể thu được/thu được bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đưa phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật sinh trưởng hoặc cho thực vật có thể thu được/thu được từ thực vật tùy ý thu được/có thể thu được bằng phương pháp nhân giống thực vật tạo ra quả không hạt theo sáng chế sinh trưởng trên đồng ruộng hoặc trong nhà kính (chẳng hạn nhà kính, nhà ống hoặc nhà lưới), cho phép thực vật được thụ phấn và thu hoạch quả không hạt. Tốt hơn là thực vật được sinh trưởng trong phương pháp tạo quả không hạt theo sáng chế là đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS.

Bất ngờ đã phát hiện ra rằng việc thụ phấn thực vật chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS ở trạng thái đồng hợp tử với phấn hoa từ một thực vật khác sẽ tạo ra thực vật tạo quả không hạt. Không dứt khoát nếu đầu nhụy của thực vật là đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS được thụ phấn bằng phấn hoa chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hoặc bằng phấn hoa chứa alen kiểu dại của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Trong trường hợp bất kỳ, không phụ thuộc vào kiểu gen của phấn hoa, cây đực là đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS sẽ tạo ra quả không hạt. Thậm chí khi được thụ phấn chéo bằng phấn hoa từ thực vật kiểu dại, thực vật theo sáng chế đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS sẽ tạo ra quả không hạt. Vì vậy, khi trồng thực vật theo sáng chế, trong mọi trường hợp sẽ thu được quả không hạt.

“Nhà kính” trong bản mô tả này sẽ được hiểu có nghĩa là tòa nhà hoặc gian nhà được dùng để cho thực vật sinh trưởng mà có mái và tường làm bằng vật liệu trong suốt bao gồm kính, nhựa, polyetylen, gaze, lưới hoặc vật liệu tương tự. Nhà kính có thể có hoặc không có các thiết bị công nghệ để gia nhiệt, làm mát, che nắng, tưới nước tự động, bón phân, điều chỉnh nồng độ cacbon dioxit v.v.. Nhà kính với loại thiết bị công nghệ bất kỳ sẽ được bao hàm bởi thuật ngữ “nhà kính” như được sử dụng ở đây.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến quả của hoặc có thể thu

được/thu được từ thực vật theo sáng chế, và/hoặc quả chứa tế bào thực vật theo sáng chế hoặc quả của thực vật có thể thu được/thu được bằng phương pháp theo sáng chế tạo ra thực vật hoặc quả của thực vật có thể thu được/thu được bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đưa phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật hoặc quả của thực vật có thể thu được/thu được từ thực vật thu được/có thể thu được bằng phương pháp theo sáng chế để nhân giống thực vật tạo ra quả không hạt hoặc quả có thể thu được/thu được bằng phương pháp theo sáng chế để tạo ra quả không hạt. Một phương án khác nữa được bao hàm của sáng chế đề cập đến quả của thực vật có thể thu được/thu được từ hạt được nộp lưu dưới số truy cập NCIMB 42532 (hoặc thể hệ con của nó), tốt hơn là quả của thực vật có thể thu được/thu được từ hạt được nộp lưu dưới số truy cập NCIMB 42532 (hoặc thể hệ con của nó) dị hợp tử hoặc đồng hợp tử đối với thể đột biến alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Quả dị hợp tử hoặc đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, trong đó quả này thu được/có thể thu được từ thực vật có nguồn gốc từ việc lai chéo một thực vật thu được từ hạt có số nộp lưu NCIMB 42532 với một thực vật khác cũng được bao gồm trong sáng chế. Quả này có thể là dị hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS và tạo ra quả mang hạt hoặc có thể là đồng hợp tử đối với alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS và tạo ra quả không hạt. Quả dị hợp tử đối với alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có thể được sử dụng để nhân giống thực vật chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS. Tốt hơn là, quả theo sáng chế là đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS và/hoặc tạo ra quả không hạt. Quả không hạt về logic không thích hợp để sinh trưởng thực vật từ những quả này. Vì vậy, theo một phương án, sáng chế đề cập đến quả theo sáng chế mà là quả không hạt không thích hợp để nhân giống hoặc không thể nhân giống hoặc là quả không nhân giống.

Một phương án khác nữa của sáng chế liên quan đến việc sử dụng phân tử axit nucleic mã hóa protein tương tự xyclin SDS được chọn từ nhóm gồm:

- a) các phân tử axit nucleic, mã hóa protein với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO 2 hoặc SEQ ID NO 4 hoặc SEQ ID NO 6 hoặc SEQ ID NO

12 hoặc SEQ ID NO 19 hoặc SEQ ID NO 20,

- b) các phân tử axit nucleic, mã hóa protein, trình tự của nó có mức đồng nhất ít nhất là 58% hoặc ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90% hoặc đặc biệt tốt hơn là ít nhất 95% với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO 2 hoặc SEQ ID NO 4 hoặc SEQ ID NO 6 hoặc SEQ ID NO 12 hoặc SEQ ID NO 19 hoặc SEQ ID NO 20;
- c) các phân tử axit nucleic, chứa trình tự nucleotit như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 hoặc SEQ ID NO 3 hoặc SEQ ID NO 5 hoặc SEQ ID NO 17 hoặc trình tự bổ trợ;
- d) các phân tử axit nucleic, mà có mức đồng nhất ít nhất 58% hoặc ít nhất 60%, tốt hơn là ít nhất 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 90% hoặc đặc biệt tốt hơn là ít nhất 95% với trình tự axit nucleic được mô tả ở mục c);
- e) các phân tử axit nucleic, lai hóa với ít nhất một sợi của các phân tử axit nucleic được mô tả ở mục a), b), c), hoặc d) trong các điều kiện nghiêm ngặt;
- f) các phân tử axit nucleic, trình tự nucleotit của chúng khác với trình tự của các phân tử axit nucleic được nhận biết trong các điều kiện a) hoặc b) do sự suy biến của mã di truyền; và
- g) các phân tử axit nucleic, mà là các đoạn, biến thể alen và/hoặc các dẫn xuất của các phân tử axit nucleic được nhận biết trong các điều kiện a), b), c) hoặc d)

để sản xuất thực vật tạo quả không hạt.

Theo một phương án được ưu tiên của việc sử dụng phân tử axit nucleic mã hóa protein tương tự xylin SDS, phân tử axit nucleic mã hóa protein tương tự xylin SDS này được sử dụng để tạo ra thực vật theo sáng chế. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, việc sử dụng phân tử axit nucleic mã hóa protein tương tự xylin SDS được sử dụng để tạo ra thực vật tạo quả không hạt theo sáng chế.

Theo các phương án được ưu tiên khác, phân tử axit nucleic mã hóa protein tương tự xylin SDS được sử dụng để sản xuất phần thực vật theo sáng chế hoặc quả

theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, phân tử axit nucleic mã hóa protein tương tự xyclin SDS được sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế được bộc lộ trong bản mô tả này. Các phân tử axit nucleic mã hóa protein tương tự xyclin SDS có thể được sử dụng chẳng hạn trong phương pháp theo sáng chế tạo ra thực vật hoặc trong phương pháp theo sáng chế bao gồm bước đưa phân tử axit nucleic ngoại lai vào tế bào thực vật hoặc trong phương pháp theo sáng chế để nhân giống thực vật tạo ra quả không hạt theo sáng chế hoặc trong phương pháp theo sáng chế để tạo ra quả không hạt.

Theo một phương án được ưu tiên khác, phân tử axit nucleic mã hóa protein tương tự xyclin SDS được sử dụng để nhận biết xem liệu thực vật hoặc tế bào thực vật có chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hoặc liệu thực vật hoặc tế bào thực vật có tổng hợp mRNA đột biến mã hóa protein tương tự xyclin SDS hoặc liệu thực vật hoặc tế bào thực vật có có hoạt tính protein tương tự xyclin SDS giảm hay không. Tốt hơn là, phân tử axit nucleic mã hóa protein tương tự xyclin SDS được sử dụng để nhận biết xem liệu quả không hạt có tạo ra thực vật tạo ra thực vật chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hay không hoặc liệu thực vật có tổng hợp mRNA đột biến mã hóa protein tương tự xyclin SDS hay không hoặc liệu thực vật có có hoạt tính protein tương tự xyclin SDS giảm hay không. Cách nhận biết các thực vật như vậy đã được mô tả trên đây trong bản mô tả này và vì vậy có thể được áp dụng ở đây.

Các phương án được ưu tiên liên quan đến các phân tử axit nucleic mã hóa protein tương tự xyclin SDS đã được mô tả trên đây và vì vậy có thể áp dụng cho việc sử dụng theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, phương pháp sàng lọc để nhận biết và/hoặc chọn lọc hạt, thực vật hoặc các phần của thực vật hoặc ADN từ những hạt, thực vật hoặc các phần của thực vật này chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS trong bộ gen của chúng được đề xuất.

Phương pháp này bao gồm bước sàng lọc ở mức ADN, ARN (hoặc cADN)

hoặc protein bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết, để phát hiện sự có mặt của alen đột biến. Có nhiều phương pháp để phát hiện sự có mặt của alen đột biến của gen.

Ví dụ nếu có một sự khác biệt nucleotit đơn lẻ (hiện tượng đa hình nucleotit đơn lẻ - single nucleotit polymorphism, SNP) giữa alen kiểu dại và alen đột biến, thử nghiệm kiểu gen SNP có thể được sử dụng để phát hiện xem liệu thực vật hoặc phần thực vật hoặc tế bào này có chứa nucleotit kiểu dại hoặc nucleotit đột biến trong bộ gen của nó hay không. Ví dụ SNP có thể dễ dàng được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm KASP (xem trang web toàn cầu [kpbioscience.co.uk](http://kpbioscience.co.uk)) hoặc các thử nghiệm kiểu gen SNP khác. Để phát triển thử nghiệm KASP, ví dụ 70 cặp bazơ ngược chiều và 70 cặp bazơ xuôi chiều của SNP có thể được lựa chọn và hai đoạn mỗi thuận đặc hiệu alen và một đoạn mỗi ngược đặc hiệu alen có thể được thiết kế. Xem tài liệu Allen et al. 2011, *Plant Biotechnology J.* 9, 1086-1099 chẳng hạn, đặc biệt là p097-1098 về phương pháp thử nghiệm KASP.

Các thử nghiệm kiểu gen tương tự khác có thể được sử dụng. Ví dụ, thử nghiệm kiểu gen TaqMan SNP, thử nghiệm nóng chảy độ phân giải cao (High Resolution Melting - HRM), thử nghiệm kiểu gen SNP (chẳng hạn Fluidigm, Illumina, v.v..) hoặc giải trình tự ADN có thể được sử dụng một cách tương tự.

Phân tích kiểu gen của các cây lưỡng bội hoặc các phần của thực vật (tế bào, lá, ADN, v.v.) có thể phân biệt kiểu gen SNP, chẳng hạn thực vật hoặc các phần chứa CC đối với nucleotit 1687 của SEQ ID NO: 1 (đồng hợp tử đối với nucleotit kiểu dại) có thể được phân biệt với thực vật hoặc các phần chứa CT đối với nucleotit 1687 của SEQ ID NO: 1 (dị hợp tử đối với nucleotit đột biến) trong bộ gen của chúng. Việc phân tích kiểu gen của thực vật hoặc các phần của thực vật tứ bội (tế bào, lá, ADN, v.v.) có thể được thực hiện theo cách tương tự như đối với các thực vật lưỡng bội, bằng cách sử dụng ví dụ thử nghiệm KASP để phân biệt kiểu gen SNP, chẳng hạn thực vật hoặc các phần chứa CCCC đối với nucleotit 1687 của SEQ ID NO: 1 (đồng hợp tử đối với nucleotit kiểu dại) có thể được phân biệt với thực vật hoặc các phần chứa các kiểu gen khác đối với SNP, chẳng hạn CCCA, CCAA, v.v. trong bộ gen của chúng. Tương tự áp dụng cho các thực vật tam bội. Tương tự cũng áp dụng cho các thực vật đa bội khác.

Theo một khía cạnh được ưu tiên, trong các phương pháp này, thực vật, tế bào thực vật và các phần của thực vật nêu trên mà chứa ít nhất một bản sao của alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS, là cây dưa hấu, đặc biệt là dưa hấu được trồng trọt, chẳng hạn dưa hấu được trồng lưỡng bội, tứ bội hoặc tam bội.

Cây dưa hấu có thể là các dòng gây giống hoặc các giống. Alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xylin SDS có thể được tạo ra trong, hoặc được đưa vào trong (chẳng hạn từ hạt được nộp lưu dưới tên NCIMB42532 hoặc thể hệ con của nó), cây dưa hấu được trồng bất kỳ để tạo ra các dòng hoặc các giống chứa alen đột biến của protein tương tự SDS, tốt hơn là ở dạng đồng hợp tử. Dưa hấu được trồng tạo ra các kích thước quả đa dạng (chẳng hạn rất nhỏ, như được mô tả trong WO2012069539, chẳng hạn nhỏ hơn 0,9 kg hoặc thậm chí bằng hoặc nhỏ hơn 0,65 kg; kích thước riêng bằng khoảng 3-7 pao, nghĩa là khoảng 1,4 đến 3,2 kg; kích thước ướp lạnh bằng khoảng 6-12 pao, nghĩa là khoảng 2,7 đến 5,5 kg; và kích thước lớn hơn lên đến 35 pao, nghĩa là khoảng 15,9 kg), màu thịt quả, và hình dáng quả và với các màu vỏ quả khác nhau. Vì vậy, thể đột biến alen có thể được đưa vào dưa hấu được trồng để tạo ra hình dạng quả bất kỳ (chẳng hạn thon dài, bầu dục, bầu dục thon dài, hình khối, hình khối thon dài, hình cầu hoặc hình tròn), bề mặt quả (chẳng hạn vết nhăn, nhăn), màu thịt quả (chẳng hạn đỏ, đỏ sẫm, đỏ tươi, đỏ san hô, cam, hồng cam hoặc hồng, vàng, vàng hoàng yến hoặc trắng), màu vỏ quả (chẳng hạn xanh lá cây nhạt; xanh lá cây sẫm; sọc xanh lá cây với các sọc nhỏ, trung bình hoặc lớn; loại xám; có hoặc không có các đốm; vàng ánh kim; vỏ quả kiểu Crimson, vỏ quả kiểu Jubilee; vỏ quả kiểu Allsweet; đen/xanh lá cây sẫm), độ dày vỏ quả, độ dai vỏ quả, kiểu vỏ quả (chẳng hạn có sọc, không sọc, mạng lưới), cấu trúc thịt quả / độ chắc thịt quả, hàm lượng lycopene và/hoặc vitamin, tỷ lệ đường/axit khác nhau, hương thơm quả tuyệt vời, v.v. bằng cách nhân giống. Xem tài liệu Guner and Wehner 2004, Hort Science 39(6): 1175-1182, đặc biệt là các trang 1180-1181 mô tả các gen đối với các đặc trưng của quả. Nhìn chung, các mục tiêu nhân giống quan trọng là chín sớm, sản lượng quả cao, chất lượng bên trong quả tốt (màu đều đẹp, hàm lượng đường cao, tỷ lệ đường: axit thích hợp, hương thơm, hàm lượng vitamin và lycopene cao, cấu trúc thịt quả chắc, cấu trúc thịt quả không xơ, không có các khiếm khuyết như rỗng ở giữa,

chết hoại vỏ, thối sau khi ra hoa hoặc có các đường khâu hình chữ thập và có các đặc tính vỏ quả tốt và sức chịu đựng tuyệt vời). Quả được tạo ra bằng dòng hoặc giống này tốt hơn là quả có thể bán được trên thị trường. Theo một khía cạnh, độ đường (brix) trung bình ít nhất là 6,0, 7,0, 8,0 hoặc ít nhất 9,0, tốt hơn là ít nhất 10,0, tốt hơn nữa là ít nhất 11,0 hoặc lớn hơn.

Màu quả có thể là màu bất kỳ, như đỏ, đỏ sẫm, đỏ tươi, đỏ san hô, cam, hồng cam, hồng, đỏ hồng, vàng, vàng hoàng yến hoặc trắng. Tốt hơn là màu thịt quả là đồng nhất.

#### Thông tin nộp lưu

Hạt *Citrullus lanatus* lưỡng bội của thực vật phân tách cho một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS đã được nộp lưu bởi Nunhems B.V. theo hiệp ước Budapest dưới số truy cập NCIMB 42532 ở NCIMB Ltd., Bucksburn Aberdeen AB21 9YA, Scotland vào ngày 27 tháng 1 năm 2016. Để nộp lưu hạt, alen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS được gọi là *emb1*. Giải pháp Expert được áp dụng.

Hạt đã nộp lưu được thu từ quá trình lai chéo ngược tự thụ phấn của một thực vật đồng hợp tử đối với alen đột biến *emb1* với một thực vật đồng hợp tử đối với alen kiểu dại *emb1*. Vì vậy 25% hạt nộp lưu là đồng hợp tử đối với alen đột biến *emb1* và tạo ra quả không hạt, 50% là dị hợp tử đối với alen đột biến này và 25% là đồng hợp tử đối với alen kiểu dại, mã hóa protein tương tự xyclin SDS kiểu dại.

Việc truy cập vào nơi nộp lưu là dễ dàng trong suốt thời hạn của đơn đối với những người có quyền yêu cầu như được xác định bởi Ủy viên sáng chế và nhãn hiệu.

Theo điều 37 C.F.R. § 1.808(b), tất cả những hạn chế được áp đặt bởi người nộp lưu về tính sẵn có để công bố một hoặc nhiều khoản mục nộp lưu sẽ bị loại bỏ theo cách không thể thay đổi ngay khi cấp bằng bằng cách cho phép truy cập vào ngân hàng nộp lưu. Ngân hàng nộp lưu sẽ được duy trì trong khoảng thời gian 30 năm, hoặc 5 năm sau lần yêu cầu gần nhất, hoặc trong toàn bộ thời gian có hiệu lực của bằng tùy thời hạn nào dài hơn, và sẽ bị thay thế nếu nó bị chết trong giai đoạn này. Người nộp đơn không từ bỏ bất kỳ quyền nào được cấp bằng cho đơn sáng chế này hoặc theo luật

bảo vệ giống cây trồng (the Plant Variety Protection Act (7 USC 2321 et seq.)).

Mô tả trình tự

SEQ ID NO 1: Trình tự bộ gen của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS kiểu đại từ *Citrullus lanatus*.

SEQ ID NO 2: Trình tự axit amin của protein tương tự SDS từ *Citrullus lanatus*. Trình tự axit amin này có nguồn gốc từ trình tự mã hóa của SEQ ID NO 1.

SEQ ID NO 3: Trình tự mARN của alen đột biến của protein tương tự xyclin SDS từ *Citrullus lanatus*.

SEQ ID NO 4: Trình tự axit amin của alen đột biến của protein tương tự SDS. Trình tự axit amin có thể bắt nguồn từ SEQ ID NO 3.

SEQ ID NO 5: Trình tự axit nucleic của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS kiểu đại từ *Cucumis melo*.

SEQ ID NO 6: Trình tự axit amin của protein tương tự SDS từ *Cucumis melo*. Trình tự axit amin nay có thể bắt nguồn từ trình tự mã hóa của SEQ ID NO 5.

SEQ ID NO 7: Trình tự nhân tạo được sử dụng làm đoạn mồi (A4532) trong PCR và/hoặc các phản ứng trình tự.

SEQ ID NO 8: Trình tự nhân tạo được sử dụng làm đoạn mồi (A4533) trong PCR và/hoặc các phản ứng trình tự.

SEQ ID NO 9: Trình tự nhân tạo được sử dụng làm đoạn mồi (A4534) trong PCR và/hoặc các phản ứng trình tự.

SEQ ID NO 10: Trình tự nhân tạo được sử dụng làm đoạn mồi (A4535) trong PCR và/hoặc các phản ứng trình tự.

SEQ ID NO 11: Trình tự nhân tạo được sử dụng làm đoạn mồi (A4538) trong PCR và/hoặc các phản ứng trình tự.

SEQ ID NO 12: Trình tự axit amin của protein tương tự SDS từ *Cucumis sativus*.

SEQ ID NO 13: trình tự của mẫu 114 và 115 của Fig. 2

SEQ ID NO 14: trình tự của mẫu 114 và 115 của Fig. 2

SEQ ID NO 15: trình tự của mẫu 116 và 117 của Fig. 2

SEQ ID NO 16: trình tự của mẫu 116 và 117 của Fig. 2

SEQ ID NO 17: Trình tự cADN của gen đột biến tương tự xyclin SDS ở dưa hấu chứa các đột biến C thành T ở nucleotit 670 tạo ra codon kết thúc ở nucleotit 670 đến 671

SEQ ID NO 18: protein đột biến tương tự xyclin SDS ở dưa hấu được mã hóa bởi cADN có SEQ ID NO 17

SEQ ID NO 19: Trình tự axit amin của protein tương tự SDS kiểu đại từ *Solanum lycopersicum*

SEQ ID NO 20: Trình tự axit amin của protein tương tự SDS kiểu đại từ *Capsicum annuum*

## Phương pháp chung

### 1. Phân lập ARN

Mô bầu nhụy non được cắt thành các miếng nhỏ, được làm lạnh trong nitơ lỏng và được bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  cho đến khi sử dụng tiếp. Các miếng mô đã làm lạnh đông được nghiền thành bột bằng pít-tông và cối trong nitơ lỏng để giữ cho bột lạnh đông. 100 mg bột được sử dụng để phân lập ARN tổng bằng cách sử dụng kit phân lập ARN thực vật theo hướng dẫn của nhà sản xuất (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen).

### 2. Điều chế cADN

ARN được xử lý bằng ADNza (TURBOADN-free, Ambion) và 0,9 $\mu\text{g}$  ARN được sử dụng để phiên mã đảo theo hướng dẫn của nhà sản xuất (iScript cADN Synthesiskit, BioRad).

### 3. PCR đối với cADN

PCR thực hiện trong tổng thể tích 20 $\mu\text{l}$  dung dịch đệm (dung dịch đệm phản ứng Phire, Thermo Fisher Scientific) chứa 0,2mM dNTP's, 0,4  $\mu\text{l}$  Phire Hot Start II

ADN Polymeraza (Thermo Fisher Scientific), 0,25 $\mu$ M mỗi đoạn mồi và 0,4  $\mu$ l hỗn hợp cADN. Sau bước làm biến tính ban đầu 30 phút ở 90°C, 40 chu trình gồm 10 giây ở 98°C, 15 giây ở 60°C và 30 giây ở 72°C được thực hiện và phản ứng được hoàn tất với 3 phút ở 72°C.

#### 4. Giải trình tự

Kích thước sản phẩm PCR được phân tích bằng cách sử dụng QIAxcel Advanced System (Qiagen) và hỗn hợp phản ứng PCR được gửi đến nhà cung cấp dịch vụ để giải trình tự (BaseClear, NL).

### Ví dụ thực hiện sáng chế

#### 1. Phân lập thể đột biến của quả không hạt

Quần thể đột biến được thiết lập bằng cách xử lý khoảng 10.000 hạt dưa hấu từ dòng lai cùng dòng (WMZD0048TYT, được viết tắt là TYT trong phần dưới đây) bằng EMS trong vài giờ và sau đó rửa hạt trong vòi nước đang chảy trong 30 phút. Sau đó, hạt được giữ ướt cho đến khi gieo trong đất. Thực vật M1 được sinh trưởng từ hạt đã được sinh đột biến, được tự thụ phấn và hạt (thể hệ M2) được thu hoạch. Tám hạt từ mỗi cây trong 3000 họ M2 được gieo trồng và cây đột biến tạo quả không hạt được phân lập. Một trong số những cây đột biến này được gọi là EMB1. Việc nhân giống của cây đột biến EMB1 được thực hiện bằng cách ghép cành của cây đột biến EMB1 với thân rễ của cây dưa hấu không được sinh đột biến.

#### 2. Xác nhận kiểu hình quả không hạt

Cây đột biến EMB1 được lai chéo ngược với cây dưa hấu không sinh đột biến ban đầu là TYT dòng lai cùng dòng, bằng cách sử dụng phấn hoa từ cây đột biến EMB1 (thể hệ BC1). 25% thực vật được sinh trưởng từ thể hệ BC1 tự thụ phấn đã tạo ra quả không hạt.

Phấn hoa từ cây đột biến EMB1 cũng được sử dụng để lai chéo với các cây dưa hấu khác thuộc dòng lai gần để tạo ra quần thể lập bản đồ. 25% thực vật tự thụ phấn của quần thể lập bản đồ tạo ra quả không hạt.

Kết quả từ quá trình lai chéo ngược và lai chéo tương ứng trong đó phấn hoa từ

cây đột biến EMB1 được sử dụng để thụ tinh cho các dòng lai gần khác đã chứng tỏ rõ ràng là phần hoa của cây đột biến EMB1 là hữu thụ.

Trong các cây đột biến EMB1 lai chéo khác, đồng hợp tử đối với alen đột biến *emb1* được dùng làm cây mẹ và được thụ phấn với phần từ các dòng còn lại khác. 100% thực vật từ mỗi quá trình lai chéo này tạo ra quả không hạt.

Kết quả thu được từ các quá trình lai chéo khác nhau chỉ ra rằng đột biến *emb1* là do một alen lặn duy nhất. Kết quả này cũng chứng tỏ rằng kiểu hình quả không hạt được duy trì khi phần hoa từ thực vật tạo hạt được dùng để thụ tinh cho cây đột biến EMB1. Vì vậy, kiểu hình quả không hạt không phải do phần hoa bất thường của thể đột biến EMB1 mà có thể là do sự khiếm khuyết trong quá trình phát triển phôi.

### 3. Nhận dạng gen gây ra kiểu hình quả không hạt

Quần thể lập bản đồ được thiết lập bằng cách thụ phấn các dòng dưa hấu lai gần khác nhau với phần hoa từ cây đột biến EMB1 được phân tích và dạng đa hình nhân đơn (single nuclear polymorphism - SNP) được phát hiện trong trình tự bộ gen như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1. SEQ ID NO 1 chỉ ra trình tự của alen kiểu dại. Trong alen tương ứng của cây đột biến EMB1, nucleotit guanin (G) ở vị trí số 2185 trong SEQ ID NO 1 được thay thế bằng adenin (A).

### 4. Phân tích mARN được phiên mã từ alen *emb1*

Nụ hoa có các kích thước khác nhau được thu hoạch từ cây được trồng trên đồng ruộng. Các mẫu số 114 và 115 là các nụ hoa từ cây thuộc dòng lai cùng dòng ban đầu, được gọi là TYY, mà được sử dụng để sinh đột biến. Vì vậy, TYY là cây kiểu dại chứa alen kiểu dại *emb1*. Các mẫu số 115 và 116 là các nụ hoa từ các cây đột biến EMB1 tạo quả không hạt chứa alen đột biến *emb1*. Tổng quan về kiểu hình, vật liệu được thu hoạch và được phân tích theo số mẫu tương ứng được nêu trong bảng 1.

| Số mẫu | Tên mẫu thực vật | Mô được thu hồi | Kiểu hình             |
|--------|------------------|-----------------|-----------------------|
| 114    | TTY (101)        | Nụ hoa 1 mm     | Quả mang hạt kiểu đại |
| 115    | TTY (102)        | Nụ hoa 3-4 mm   | Quả mang hạt kiểu đại |
| 116    | EMB1 (103)       | Nụ hoa 1 mm     | Quả không hạt         |
| 117    | EMB1 (104)       | Nụ hoa 3-4 mm   | Quả không hạt         |

Bảng 1

ARN được phân lập từ nụ hoa của các số mẫu khác nhau. 700ng ARN đối với mỗi số mẫu được sử dụng để phân tích cADN. Phản ứng PCR bằng cách sử dụng đoạn mồi A4532 (SEQ ID NO 7) và A4533 (SEQ ID NO 8) được thực hiện trên mỗi mẫu cADN thu được. Các đoạn mồi được thiết kế để khuếch đại một phần của alen *emb1* của trình tự mã hóa được chỉ ra trong SEQ ID NO 1. Các sản phẩm PCR được phân tích trên gel polyacrylamit được chỉ ra trên Fig. 3. Từ Fig. 3 có thể dễ dàng suy ra rằng, các mẫu số 116 và 117 tạo ra đoạn PCR ngắn hơn so với tất cả các mẫu khác. Điều này rõ ràng đã chỉ ra rằng mARN của alen đột biến *emb1* chứa sự xóa đoạn nucleotit so với alen kiểu đại tương ứng trong các mẫu số 114 và 115.

#### 5. Phân tích trình tự cADN của alen *emb1*

cADN của các mẫu số 114, 115, 116 và 117 được giải trình tự bằng cách sử dụng đoạn mồi A4532 như được chỉ ra trong SEQ ID NO 7, đoạn mồi A4538 như được chỉ ra trong SEQ ID NO 11, đoạn mồi A4534 SEQ ID NO 9 và đoạn mồi A4535 SEQ ID NO 10. Các trình tự thu được từ mỗi mẫu số 116 và 117 là như được chỉ ra trong SEQ ID NO 3 ở dạng phân tử mARN. Các trình tự thu được từ mỗi mẫu số 114 và 115 là giống hệt trình tự mã hóa được chỉ ra trong SEQ ID NO 1. So sánh các trình tự thu được từ các mẫu số 114, 115, 116 và 117 chỉ ra rằng các trình tự của mỗi mẫu số 116 và 117 có sự xóa đoạn của 16 nucleotit bảo toàn so với các trình tự của mỗi mẫu số 114 và 115. Ngoài ra, các trình tự của mỗi mẫu số 116 và 117 có sự dịch chuyển khung mà gây ra codon kết thúc sớm trong trình tự mã hóa, so với các trình tự của mỗi mẫu số 114 và 115. Việc sắp thẳng hàng các phân trình tự có liên quan được chỉ ra trên Fig. 2.

Kết luận rằng, alen đột biến *emb1* của các mẫu số 116 và 117 được phiên mã

thành mRNA mà có sự xóa đoạn, sự dịch chuyển khung trong khung đọc và codon kết thúc sớm so với mRNA được phiên mã từ alen kiểu dại của mẫu số 114 và 115. Ngoài ra, từ Fig. 2 có thể được nhận thấy rằng mRNA được phiên mã từ alen đột biến *embl* của các mẫu số 116 và 117 mã hóa protein trong đó 8 axit amin thay đổi so với protein được mã hóa bởi mRNA được phiên mã từ alen kiểu dại của các mẫu số 114 và 115.

#### 6. Tạo ra cây dưa hấu đột biến khác

Việc biết rõ về trình tự gen tương tự cyclin SDS khiến cho có thể tạo ra các alen đột biến khác ở gen tương tự SDS. Quần thể TILLING được sinh đột biến bởi EMS được sàng lọc với các đoạn mồi được thiết kế trên một miền trong đó đột biến EMS có thể chuyển hóa codon mã hóa axit amin thành codon kết thúc.

Mồi xuôi: CGAAGAGAAAGGATTAGACGTTG (SEQ ID NO: 21)

Mồi ngược: TCTGAGCAGTCAGTATCAGACG (SEQ ID NO: 22)

Cây được nhận biết chứa alen đột biến tương tự cyclin SDS. Alen đã nhận biết chứa một thay thế nucleotit duy nhất ở nucleotit 1687 của SEQ ID NO: 1, tạo thành codon kết thúc. Vì vậy, thể đột biến alen mã hóa protein tương tự cyclin SDS đã bị cắt cụt chỉ bao gồm các axit amin từ 1 đến 223 của protein kiểu dại có SEQ ID NO: 2. cADN của thể đột biến alen được đề xuất trong SEQ ID NO: 17 và protein bị cắt cụt được mã hóa bởi thể đột biến alen được đề xuất trong SEQ ID NO: 18.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tế bào cây dừa hấu, đặc trưng ở chỗ tế bào cây này chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, trong đó alen đột biến này chứa đột biến trong một hoặc nhiều trình tự điều tiết dẫn đến sự biểu hiện gen giảm với sản phẩm phiên mã giảm đi ít nhất 70% hoặc không có sự biểu hiện gen so với alen kiểu dại tương ứng, hoặc trong đó alen đột biến này mã hóa protein bao gồm sự khuyết đoạn, sự cắt cụt, cài xen hoặc thay thế của một hoặc nhiều axit amin, so với protein được mã hóa bởi alen kiểu dại, dẫn đến sự giảm chức năng hoặc mất chức năng của protein tương tự xyclin SDS và trong đó cây dừa hấu chứa tế bào cây này tạo ra quả không hạt nhờ thụ phấn khi alen đột biến này ở dạng đồng hợp tử,

trong đó protein tương tự xyclin SDS của alen kiểu dại được mã hóa bởi các phân tử axit nucleic được chọn từ nhóm gồm:

a) các phân tử axit nucleic, mã hóa protein với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO 2;

b) các phân tử axit nucleic, mã hóa protein, trình tự của nó có mức đồng nhất ít nhất 90% với trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO 2;

c) các phân tử axit nucleic, chứa trình tự nucleotit như được chỉ ra trong SEQ ID NO 1 hoặc trình tự bổ trợ của nó;

d) các phân tử axit nucleic, có mức đồng nhất ít nhất 90% với trình tự axit nucleic được mô tả ở c); và

e) các phân tử axit nucleic, trình tự nucleotit của nó khác với trình tự của các phân tử axit nucleic được xác định ở a) hoặc b) do sự suy biến của mã di truyền.

2. Tế bào cây dừa hấu theo điểm 1, trong đó alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS mã hóa protein trong đó một hoặc nhiều axit amin được cài xen, thay thế hoặc khuyết đoạn trong miền xyclin\_C và/hoặc miền xyclin\_N bảo toàn của protein hoặc trong đó toàn bộ hoặc một phần của miền xyclin\_C và/hoặc miền xyclin\_N bảo toàn không có mặt.

3. Cây dừa hấu chứa tế bào cây dừa hấu theo điểm 1 hoặc 2.

4. Hạt mà từ đó cây dưa hấu theo điểm 3 có thể được sinh trưởng.

5. Phương pháp chọn lọc cây dưa hấu bao gồm các bước:

a) nhận biết cây dưa hấu có đột biến ở alen mã hóa gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS trong đó alen kiểu dại của gen này mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất về trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO 2, trong đó alen đột biến ở bước a) chứa đột biến trong một hoặc nhiều trình tự điều tiết dẫn đến sự biểu hiện gen giảm với sản phẩm phiên mã giảm đi ít nhất 70% hoặc không có sự biểu hiện gen hoặc trong đó alen đột biến mã hóa protein bao gồm sự khuyết đoạn, sự cắt cụt, cài xen hoặc thay thế của một hoặc nhiều axit amin, so với protein được mã hóa bởi alen kiểu dại, dẫn đến sự giảm chức năng hoặc mất chức năng của protein tương tự xyclin SDS và tạo ra quả không hạt nhờ thụ phấn khi alen đột biến ở dạng đồng hợp tử.

6. Phương pháp chọn lọc cây dưa hấu theo điểm 5, còn bao gồm các bước:

b) xác định xem liệu cây này có hữu thụ đực hay không và liệu cây này, hoặc cây con được tạo ra bằng cách tự thụ tinh, có tạo ra quả không hạt hay không và/hoặc

c) chọn lọc cây chứa ít nhất một bản sao của alen đột biến ở bước a).

7. Phương pháp tạo ra cây dưa hấu bao gồm các bước:

a) đưa đột biến vào quần thể thực vật,

b) chọn lọc cây hữu thụ đực tạo quả không hạt, và

c) xác minh xem liệu thực vật được chọn lọc ở bước b) có đột biến ở alen mã hóa gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hay không và chọn lọc cây chứa đột biến này, trong đó alen kiểu dại của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất về trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO 2.

8. Phương pháp tạo ra cây dưa hấu theo điểm 7, còn bao gồm bước

d) sinh trưởng/trồng các cây thu được ở bước c).

9. Phương pháp tạo ra cây dưa hấu bao gồm các bước:

a) đưa phân tử axit nucleic ngoại lai vào cây dưa hấu, trong đó phân tử axit nucleic ngoại lai được chọn từ nhóm gồm:

i) các phân tử ADN, mã hóa ít nhất một ARN đối nghĩa, tạo ra sự giảm biểu hiện của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất về trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO 2;

ii) các phân tử ADN, mà nhờ tác dụng đồng kim hãm dẫn đến sự giảm biểu hiện của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất về trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO 2;

iii) các phân tử ADN, mã hóa ít nhất một ribozym, phân tách sản phẩm phiên mã cụ thể của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất về trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO 2;

iv) các phân tử ADN, đồng thời mã hóa ít nhất một ARN đối nghĩa và ít nhất một ARN có nghĩa, trong đó ARN đối nghĩa đã nêu và ARN có nghĩa đã nêu tạo thành một phân tử ARN sợi kép, gây ra sự giảm sự biểu hiện của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất về trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO 2 (công nghệ ARNi);

v) các phân tử axit nucleic được đưa vào bằng cách sinh đột biến *in vivo*, dẫn đến sự đột biến hoặc sự cài xen một trình tự khác loài trong gen nội sinh mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất về trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO 2, trong đó sự đột biến hoặc sự cài xen gây ra sự giảm sự biểu hiện của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS hoặc dẫn đến sự tổng hợp của protein tương tự xyclin SDS bất hoạt;

vi) các phân tử axit nucleic, mã hóa kháng thể, trong đó kháng thể này dẫn đến sự giảm hoạt tính của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất về trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO 2 do việc gắn kết giữa kháng thể với protein nội sinh tương tự xyclin SDS,

vii) phân tử ADN, chứa các gen nhảy, trong đó sự hợp nhất của các gen nhảy này dẫn đến sự đột biến hoặc sự cài xen trong gen nội sinh mã hóa protein tương tự xyclin SDS có mức đồng nhất về trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO 2, mà nó dẫn đến sự giảm biểu hiện của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xyclin SDS, hoặc dẫn đến sự tổng hợp của protein tương tự xyclin SDS bất hoạt;

viii) phân tử T-ADN, mà do sự cài xen trong gen nội sinh mã hóa protein tương tự xylin SDS có mức đồng nhất về trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO 2, dẫn đến sự giảm biểu hiện của gen nội sinh mã hóa protein tương tự xylin SDS, hoặc dẫn đến sự tổng hợp của protein tương tự xylin SDS bất hoạt;

ix) các phân tử axit nucleic mã hóa endonucleaza ít phân cắt hoặc endonucleaza ít phân cắt được thiết kế theo yêu cầu, meganucleaza, TALEN hoặc hệ CRISPR/Cas, và

b) chọn lọc cây hữu thụ được trong đó cây, hoặc thể hệ con của cây được tạo ra bằng cách tự thụ tinh, tạo ra quả không hạt.

10. Phương pháp tạo ra cây dưa hấu theo điểm 9, còn bao gồm các bước:

c) xác định xem liệu cây thu được ở bước b) có hoạt tính của protein tương tự xylin SDS giảm so với cây kiểu dại mà không có các phân tử axit nucleic ngoại lai được hợp nhất vào bộ gen của nó hay không, và/hoặc

d) sinh trưởng/trồng cây thu được ở bước c).

11. Cây dưa hấu thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 10.

12. Đoạn cắt hoặc vật liệu nhân giống sinh dưỡng của cây dưa hấu chứa tế bào cây dưa hấu theo điểm 1 hoặc 2, hoặc phần của cây dưa hấu theo điểm 11, chứa các tế bào mang đột biến ở alen mã hóa gen mã hóa protein tương tự xylin SDS hoặc chứa các tế bào chứa phân tử axit nucleic ngoại lai theo điểm 9.

13. Vật liệu nhân giống chứa tế bào cây dưa hấu theo điểm 1 hoặc 2 hoặc vật liệu nhân giống có thể thu được từ cây dưa hấu theo điểm 3 hoặc điểm 11 trong đó vật liệu nhân giống này chứa tế bào mang đột biến ở alen mã hóa gen mã hóa protein tương tự xylin SDS hoặc vật liệu nhân giống này chứa tế bào chứa phân tử axit nucleic ngoại lai theo điểm 9.

14. Quả chứa tế bào cây dưa hấu theo điểm 1 hoặc 2 hoặc quả có thể thu được từ cây dưa hấu theo điểm 3 hoặc 11 hoặc quả có thể thu được từ vật liệu nhân giống theo điểm 13.

15. Cây dưa hấu theo điểm 3 hoặc hạt theo điểm 4, trong đó cây hoặc hạt đã nêu đồng hợp tử đối với một alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS.
16. Phương pháp tạo ra quả dưa hấu không hạt bao gồm bước trồng cây dưa hấu theo điểm 15 và cho phép cây dưa hấu đã nêu thụ phấn và thu hoạch quả không hạt.
17. Vật liệu nhân giống theo điểm 13, trong đó vật liệu nhân giống này là cây đã được nhân giống sinh dưỡng.
18. Cây dưa hấu theo điểm 3 hoặc hạt theo điểm 4, trong đó cây hoặc hạt này là cây dưa hấu lưỡng bội, tam bội hoặc tứ bội.
19. Tế bào cây dưa hấu theo điểm 1, trong đó alen đột biến mã hóa protein, trong đó ít nhất 25 axit amin bị mất từ đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của trình tự axit amin so với protein tương tự xyclin SDS kiểu đại tương ứng.
20. Tế bào cây dưa hấu theo điểm 1 chứa alen đột biến của gen mã hóa protein tương tự xyclin SDS, trong đó alen đột biến này mã hóa protein cắt cụt không chứa các axit amin từ 358 đến 562 của protein kiểu đại có SEQ ID NO: 2 hoặc không chứa các axit amin từ 224 đến 562 của protein kiểu đại có SEQ ID NO: 2.
21. Tế bào cây dưa hấu theo điểm 1, trong đó alen đột biến mã hóa protein có SEQ ID NO: 4 hoặc có SEQ ID NO: 18.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NUNHEMS B. V.

<120> TẾ BÀO CÂY DƯA HẦU CÓ HOẠT TÍNH PROTEIN TƯƠNG TỰ XYCLIN SDS GIẢM SO  
VỚI TẾ BÀO CÂY DƯA HẦU KIỂU ĐẠI TƯƠNG ỨNG, CÂY DƯA HẦU CHỨA TẾ BÀO NÀY,  
PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY DƯA HẦU, CÁC PHẦN CỦA CÂY DƯA HẦU, VẬT LIỆU NHÂN  
GIỐNG LIÊN QUAN, HẠT VÀ QUẢ, VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA QUẢ KHÔNG HẠT

<130> BCS 16-8014

<150> EP16171462.1

<151> 2016-05-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5135

<212> ADN

<213> Citrullus lanatus

<220>

<221> exon

<222> (1018)..(2088)

<220>

<221> CDS

<222> (1018)..(2088)

<220>

<221> Intron

<222> (2089)..(2185)

<220>

<221> exon

<222> (2186)..(2353)

<220>

<221> CDS

<222> (2186)..(2353)

<220>

<221> Intron

<222> (2354)..(3098)

<220>

<221> exon

<222> (3099)..(3265)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (3099)..(3265)

<220>  
 <221> Intron  
 <222> (3266)..(4324)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (4325)..(4607)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (4325)..(4604)

<400> 1  
 aaacattcat acttttgaag aaaattagta tattatttat ttatattata tttacagatt 60  
 atttattgat ttttttttaa atatttattg aattttttat aatataataa aaatgtcgac 120  
 atgtcaacac aaaattaatt tcatattatg aattagaagt agggaataag agtatgtttg 180  
 gaataaatTT tcaagtattt aatttttaaaa ataagtcact tcaaaagaaa tataagtgtt 240  
 tggcaaccac tcaaactgta ttttaaaagc cattagtgtc tttattataa atacttttct 300  
 tatcaaaagt gtttaaatga aaataaaagt ttgaagacat ttcttttcta ggttaatcga 360  
 atggcttcta aatttaagat ttatcaaagtg tatatggtat gtttggttca aaagagtttt 420  
 tgagcttata attaaagaac atcaatctca tgacttatca attttttgta atgtgtatTT 480  
 aaaaaaaaaa agaaataaaa aagaaaaaga aaagaaaaac attttgtaat aggaccctac 540  
 aattaaacaa tttaggacat gtctagggag tgattctaaa atagttaaAT ccacttttgt 600  
 tattattgaa atcactttta aatatttcaa atcttccaaa cacaaaattt attatataaa 660  
 aattatactt aaaaatgtaa aattaaatac taaattaatt tggagtgatt taatatatgt 720  
 tttgggggata tatccatttc aaaatcactc caaatatgaa tttcataaaa ttaaagttga 780  
 atatttgaaa gtagaagact aaaatggaaa agaatataga ggtgaggggc caaaatgata 840  
 ttttaactaaa taattattat tatttattag attagcacga gaggaggtga cagtgagggg 900  
 ccctctccaa aaaaaaaaaa aactcacttc caattcacia ttctcttttg cttcctaact 960  
 tccataactg ctctgctttc catcacgaaa ctcatcttca tcttcttcat tcgaaca 1017  
 atg aag tcc aag aag cca agg gca aat ccc aaa ccc gaa tcc tac tct 1065

|                   |                  |                  |                   |                  |                   |            |                  |            |                  |                   |            |                  |            |            |                   |      |
|-------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------|------------------|------------|------------------|-------------------|------------|------------------|------------|------------|-------------------|------|
| Met<br>1          | Lys              | Ser              | Lys               | Lys<br>5         | Pro               | Arg        | Ala              | Asn        | Pro<br>10        | Lys               | Pro        | Glu              | Ser        | Tyr<br>15  | Ser               |      |
| ccg<br>Pro        | ccg<br>Pro       | aag<br>Lys       | aag<br>Lys        | aag<br>Lys       | ctc<br>Leu        | cgt<br>Arg | tct<br>Ser       | cag<br>Gln | ctt<br>Leu       | cca<br>Pro        | cgg<br>Arg | cgc<br>Arg       | aga<br>Arg | cgc<br>Arg | tct<br>Ser        | 1113 |
| cgg<br>Arg        | att<br>Ile       | tct<br>Ser<br>35 | cct<br>Pro        | ttt<br>Phe       | ttc<br>Phe        | tgc<br>Cys | tcc<br>Ser<br>40 | ttg<br>Leu | gac<br>Asp       | tcc<br>Ser        | gat<br>Asp | tcc<br>Ser<br>45 | cct<br>Pro | gct<br>Ala | cct<br>Pro        | 1161 |
| tct<br>Ser        | acc<br>Thr<br>50 | acc<br>Thr       | att<br>Ile        | gct<br>Ala       | ttt<br>Phe        | gct<br>Ala | tct<br>Ser       | tct<br>Ser | tcc<br>Ser       | ttt<br>Phe        | gct<br>Ala | gcc<br>Ala       | gcc<br>Ala | gaa<br>Glu | tcc<br>Ser        | 1209 |
| agc<br>Ser<br>65  | tcc<br>Ser       | act<br>Thr       | tcc<br>Ser        | ttc<br>Phe       | cac<br>His<br>70  | gca<br>Ala | ggc<br>Gly       | gga<br>Gly | cct<br>Pro       | gag<br>Glu        | gtt<br>Val | tct<br>Ser       | agc<br>Ser | cag<br>Gln | ctc<br>Leu<br>80  | 1257 |
| aac<br>Asn        | gcg<br>Ala       | tgt<br>Cys       | ttt<br>Phe        | gga<br>Gly<br>85 | ttc<br>Phe        | cag<br>Gln | agg<br>Arg       | ccg<br>Pro | aat<br>Asn<br>90 | ttg<br>Leu        | cgg<br>Arg | aag<br>Lys       | aga<br>Arg | cga<br>Arg | ttt<br>Phe        | 1305 |
| ggt<br>Gly        | tcg<br>Ser       | ggt<br>Gly       | ggt<br>Gly<br>100 | gtt<br>Val       | aat<br>Asn        | ttg<br>Leu | gat<br>Asp       | gaa<br>Glu | gtt<br>Val       | tcg<br>Ser        | aag<br>Lys | aag<br>Lys       | gag<br>Glu | gtt<br>Val | gga<br>Gly        | 1353 |
| gta<br>Val        | ggg<br>Gly       | agt<br>Ser       | aat<br>Asn        | gtg<br>Val       | gaa<br>Glu        | gtg<br>Val | tct<br>Ser       | gaa<br>Glu | tcg<br>Ser       | tct<br>Ser        | tgc<br>Cys | gtt<br>Val       | gaa<br>Glu | tca<br>Ser | aat<br>Asn        | 1401 |
| tct<br>Ser        | gga<br>Gly       | gtt<br>Val       | gat<br>Asp        | ttt<br>Phe       | ggt<br>Gly        | gtt<br>Val | ctc<br>Leu       | gga<br>Gly | cca<br>Pro       | agc<br>Ser        | act<br>Thr | agc<br>Ser       | tcc<br>Ser | agg<br>Arg | ttg<br>Leu        | 1449 |
| aag<br>Lys<br>145 | att<br>Ile       | aga<br>Arg       | agt<br>Ser        | gat<br>Asp       | ttt<br>Phe<br>150 | agg<br>Arg | aga<br>Arg       | act<br>Thr | att<br>Ile       | gac<br>Asp<br>155 | gaa<br>Glu | aat<br>Asn       | gaa<br>Glu | gat<br>Asp | cca<br>Pro<br>160 | 1497 |
| atc<br>Ile        | gat<br>Asp       | caa<br>Gln       | gcg<br>Ala        | gat<br>Asp       | aat<br>Asn        | gga<br>Gly | gtt<br>Val       | gtg<br>Val | aag<br>Lys       | ttt<br>Phe        | caa<br>Gln | ttg<br>Leu       | acg<br>Thr | gat<br>Asp | gct<br>Ala        | 1545 |
| gat<br>Asp        | gtc<br>Val       | tcg<br>Ser       | tcg<br>Ser        | aag<br>Lys       | ctt<br>Leu        | tgt<br>Cys | gaa<br>Glu       | aag<br>Lys | gga<br>Gly       | gct<br>Ala        | gtg<br>Val | cca<br>Pro       | ctc<br>Leu | act<br>Thr | cct<br>Pro        | 1593 |
| tgt<br>Cys        | gga<br>Gly       | gag<br>Glu       | tct<br>Ser        | tgc<br>Cys       | gct<br>Ala        | gag<br>Glu | tct<br>Ser       | atc<br>Ile | ttc<br>Phe       | cag<br>Gln        | agc<br>Ser | gtt<br>Val       | tgt<br>Cys | tcg<br>Ser | ttc<br>Phe        | 1641 |
| gaa               | gag              | aaa              | gga               | tta              | gac               | gtt        | gaa              | gaa        | aac              | aga               | cta        | tgg              | gaa        | ttt        | cag               | 1689 |

|            |             |            |            |            |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
| Glu        | Glu         | Lys        | Gly        | Leu        | Asp        | Val        | Glu        | Glu        | Asn | Arg | Leu | Trp | Glu | Phe | Gln |      |  |
| 210        |             |            |            |            |            | 215        |            |            |     |     | 220 |     |     |     |     |      |  |
| tta        | cca         | gaa        | cta        | ccg        | aga        | aat        | gag        | atc        | aat | gaa | act | ttc | act | gtt | tcg | 1737 |  |
| Leu        | Pro         | Glu        | Leu        | Pro        | Arg        | Asn        | Glu        | Ile        | Asn | Glu | Thr | Phe | Thr | Val | Ser |      |  |
| 225        |             |            |            |            | 230        |            |            |            |     | 235 |     |     |     |     | 240 |      |  |
| aag        | tcg         | gat        | tcg        | acg        | ata        | gaa        | cag        | tgg        | cct | aat | agc | ttg | aag | ttt | gaa | 1785 |  |
| Lys        | Ser         | Asp        | Ser        | Thr        | Ile        | Glu        | Gln        | Trp        | Pro | Asn | Ser | Leu | Lys | Phe | Glu |      |  |
|            |             |            |            | 245        |            |            |            |            | 250 |     |     |     |     | 255 |     |      |  |
| tcg        | gat         | ctt        | gct        | tgc        | acg        | gag        | caa        | ttc        | tct | tat | gag | aat | gtt | tcg | gaa | 1833 |  |
| Ser        | Asp         | Leu        | Ala        | Cys        | Thr        | Glu        | Gln        | Phe        | Ser | Tyr | Glu | Asn | Val | Ser | Glu |      |  |
|            |             |            | 260        |            |            |            |            | 265        |     |     |     |     | 270 |     |     |      |  |
| tac        | tct         | agc        | cag        | gcg        | ttg        | tcc        | gag        | ctt        | caa | tca | aca | att | cta | ttg | gag | 1881 |  |
| Tyr        | Ser         | Ser        | Gln        | Ala        | Leu        | Ser        | Glu        | Leu        | Gln | Ser | Thr | Ile | Leu | Leu | Glu |      |  |
|            |             | 275        |            |            |            |            | 280        |            |     |     |     | 285 |     |     |     |      |  |
| acg        | tct         | gat        | act        | gac        | tgc        | tca        | gat        | tac        | act | cct | tca | att | ttt | ttg | gaa | 1929 |  |
| Thr        | Ser         | Asp        | Thr        | Asp        | Cys        | Ser        | Asp        | Tyr        | Thr | Pro | Ser | Ile | Phe | Leu | Glu |      |  |
|            | 290         |            |            |            |            | 295        |            |            |     |     | 300 |     |     |     |     |      |  |
| tcc        | gga         | agc        | gaa        | ttt        | tca        | gag        | aaa        | tcg        | aac | gac | gac | gca | gct | cct | tcg | 1977 |  |
| Ser        | Gly         | Ser        | Glu        | Phe        | Ser        | Glu        | Lys        | Ser        | Asn | Asp | Asp | Ala | Ala | Pro | Ser |      |  |
| 305        |             |            |            |            | 310        |            |            |            |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |  |
| tca        | aca         | ttt        | agc        | atg        | ttg        | ctg        | cag        | tac        | aga | cgc | gac | ttt | cta | aac | tta | 2025 |  |
| Ser        | Thr         | Phe        | Ser        | Met        | Leu        | Leu        | Gln        | Tyr        | Arg | Arg | Asp | Phe | Leu | Asn | Leu |      |  |
|            |             |            |            | 325        |            |            |            |            | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |  |
| aat        | gcc         | tct        | cca        | gac        | atc        | aga        | act        | agc        | tcg | tct | att | gaa | gaa | gag | aaa | 2073 |  |
| Asn        | Ala         | Ser        | Pro        | Asp        | Ile        | Arg        | Thr        | Ser        | Ser | Ser | Ile | Glu | Glu | Glu | Lys |      |  |
|            |             |            | 340        |            |            |            |            | 345        |     |     |     |     | 350 |     |     |      |  |
| gta        | gat         | caa        | tct        | acg        | gtaattcgct | atcttcatgc | ttccttgacg | tttcatttgc |     |     |     |     |     |     |     | 2128 |  |
| Val        | Asp         | Gln        | Ser        | Thr        |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|            |             |            | 355        |            |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| aacaaacctg | aagctaataca | aacaactata | tatatatatt | atttgatttt | aaattag    |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     | 2185 |  |
| att        | ttg         | aga        | ttt        | gaa        | gaa        | ttg        | gac        | gat        | gaa | gaa | gcc | tat | cta | atg | ttc | 2233 |  |
| Ile        | Leu         | Arg        | Phe        | Glu        | Glu        | Leu        | Asp        | Asp        | Glu | Glu | Ala | Tyr | Leu | Met | Phe |      |  |
|            |             | 360        |            |            |            |            | 365        |            |     |     |     | 370 |     |     |     |      |  |
| aga        | agt         | aga        | gaa        | aga        | cgc        | caa        | ttg        | att        | att | cgc | gac | tac | gta | gag | gag | 2281 |  |
| Arg        | Ser         | Arg        | Glu        | Arg        | Arg        | Gln        | Leu        | Ile        | Ile | Arg | Asp | Tyr | Val | Glu | Glu |      |  |
|            |             | 375        |            |            |            | 380        |            |            |     |     | 385 |     |     |     |     |      |  |
| tat        | cgg         | tcc        | aca        | acg        | gat        | tat        | ggc        | gat        | ctc | att | ctc | cag | caa | cgg | tca | 2329 |  |
| Tyr        | Arg         | Ser        | Thr        | Thr        | Asp        | Tyr        | Gly        | Asp        | Leu | Ile | Leu | Gln | Gln | Arg | Ser |      |  |
| 390        |             |            |            |            | 395        |            |            |            |     | 400 |     |     |     |     | 405 |      |  |

aat gtg gtc caa tgg ata gtt gaa gtaagtcctt gataccaaac caccgtgttt 2383  
 Asn Val Val Gln Trp Ile Val Glu  
 410

ctctcaataa ttctgaatt agcatgagat attttgctcc ggttttccat tttcatcggt 2443  
 aatagcattg gtattctgag acattggaac tgttttagtgt atcgaggtag tttgaagcac 2503  
 tgactctcat atttcaattt gcactgaatc gctaattagt tcttaacatc tcataaaatg 2563  
 agttcccttg ccttatttgc tatggaactt tatccgacag cgtacttttc tgatttggtt 2623  
 atcccaacaa tgtgatttac taatgaaaat tacaaagtca ttaccatgat catactttcc 2683  
 actacttaaa agccagcagt ttatgatctt gcacctgtta catctagttg ttataagctc 2743  
 attctaacga atgaggcctg ccaccagcac aacgcatctg gcatcttgaa tcaactaagt 2803  
 ttaactgatt tttcatttct tttcttactt ctgcttgaat atattttctg tttgtttttc 2863  
 atcttaataa tagaatacag attcataacc gcgagatttg tgcttattac tgtggatggt 2923  
 gacattttct taggaatact ccaatgtagt tgcattttca tcatctgttg acgtttctag 2983  
 ttcaaggaat acattcttta tactattttt attccttttc tgcgttaata cttgtcacca 3043  
 accaattggg tcaaattttt tacattatgt tgctttgttt tgttgaatga tgcag cga 3101  
 Arg

tcg aga gat tcc aaa ctt cat cag gag acg aca ttt tta gga gtt acc 3149  
 Ser Arg Asp Ser Lys Leu His Gln Glu Thr Thr Phe Leu Gly Val Thr  
 415 420 425 430

ctc ctg gac cag att ctg agc aga gga ttc ttc aaa gct gga aga cac 3197  
 Leu Leu Asp Gln Ile Leu Ser Arg Gly Phe Phe Lys Ala Gly Arg His  
 435 440 445

ctt caa att ctg ggc ata gca tgt cta act ttg gcg act aga att gaa 3245  
 Leu Gln Ile Leu Gly Ile Ala Cys Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ile Glu  
 450 455 460

gaa aat cag tca tac agc tg gtgacttttt ttctatcttt tgtctatttg 3295  
 Glu Asn Gln Ser Tyr Ser Trp  
 465

tgtgcatctc agttttaact atataacaag tgttgttctt atctactgta acttcaactt 3355  
 aacttcgtta gtatgatgaa tattgcttga aaacaaactg tatgccagtt ggtottcttg 3415  
 ttctgatcca aggagtgaa attgggtaag ttaggatcga atgctaagta gtactagaaa 3475

```

taataatcag aaagaattgt attaaagtaa ttgaatctaa tagtcttgaa ttttttttct 3535
aaagttcaaaa gtgtcgagcc tgaaagcttt gcgtttacat ggaccaaagt aatgttgtga 3595
atatatcgta ggtcctctta tagcaattat gtaacaaata atagccatac attagtgtcg 3655
atacacacca cccgtacggg actgtagtgc aatattgcca taacactatc tttcagttct 3715
tatgttaaca attcatgtgc acagaagaga cccgagaccc accaagaaaa cattatcttt 3775
gacttgtata tagaactcta agtcgagtca aatgtaaaac aattcttttt cttctcttct 3835
ctttctcaaa cttccttttg tagccttcat ttatctttga cttgcaattt acatgcaaaa 3895
tggttaaataa ttgtgatttg tttaattaaa tagagccttg tgaattgaga aggtatccaa 3955
gctagctggg gggctctcgag cttgggtggat atatttataa agctatgata ggactgattt 4015
gttttatttt tgggcatttc aggggtgcagc aaaggaatat ccgtgtagag agcaacacgt 4075
acagaagatc tgaagttggt ggcatggaat ggcttgttga agaagtctta aagttccatt 4135
gtttcttgcc aactgtttac aacttcttat ggtacatctt cctttgacta acttgaccat 4195
tggtgggaag ggaaaaagtt ttccctttcg tgcattccatt ttcaataaac tccttccgcc 4255
cattaacaat ttgaatctac tgcgaataac atgctttatt taattttctt tttttgaaaa 4315
ttatcttag g ttc tac ctg aaa gct gct gga gct gac tcg aat ttg gag 4364
      Phe Tyr Leu Lys Ala Ala Gly Ala Asp Ser Asn Leu Glu
      470                               475                               480

aat cga gct aag aac ttt gcg gag ctg gtt ctt tca gac aaa gtc caa 4412
Asn Arg Ala Lys Asn Phe Ala Glu Leu Val Leu Ser Asp Lys Val Gln
      485                               490                               495

ttt tgt tat ttc cct tca act att gca gct gcg gtt gtc atc ttg gcg 4460
Phe Cys Tyr Phe Pro Ser Thr Ile Ala Ala Ala Val Val Ile Leu Ala
      500                               505                               510

tcc cta gga gaa aaa caa gat gca cca agt caa cga gtc att gag gta 4508
Ser Leu Gly Glu Lys Gln Asp Ala Pro Ser Gln Arg Val Ile Glu Val
      515                               520                               525                               530

cat aaa tac aaa tac ctg tta gag aga aaa ctc ctt tat ctt tat att 4556
His Lys Tyr Lys Tyr Leu Leu Glu Arg Lys Leu Leu Tyr Leu Tyr Ile
      535                               540                               545

gac cca att gaa caa ata aac aag tat ttt gaa atc gag aag aaa ctt 4604
Asp Pro Ile Glu Gln Ile Asn Lys Tyr Phe Glu Ile Glu Lys Lys Leu
      550                               555                               560

```

taa agttttacaa aaacaccata atctaaatcc aattagattc aactgtaatg 4657  
 taaagtacaa taataaaata catataccat aaggaaatgg taggttatag tgtttgtttc 4717  
 aattagatat tcaatttata tattagttag tgttgttaat ctccctgaat atttcttact 4777  
 aacttgagga aggtctcctg tcttctggaa acccttccat gcccaaaatt tcagccttct 4837  
 gctattccca ttaagtcaaa catgtaatga gtttactttt ctttctcctt ctaattatta 4897  
 attattttta ataatttatt tgtctaattc attttctgta gtctgaaccc acgaacttgc 4957  
 ttatcacaaa atccaaaacc aaaaacccca tcacaatttt ggaaatcttt ttgagaactg 5017  
 ctactataac catgtaattt ctttcaaaat ctacaaaaat agaaataaca cttattttaga 5077  
 ctatctgtgg tactatctca taacatctgg tgcattgtgg ctttgcagac gcatgtca 5135

<210> 2  
 <211> 562  
 <212> PRT  
 <213> Citrullus lanatus

<400> 2

Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser  
 1 5 10 15

Pro Pro Lys Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Arg Ser  
 20 25 30

Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro  
 35 40 45

Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser  
 50 55 60

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

Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe  
 85 90 95

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Gly | Ser | Asn | Val | Glu | Val | Ser | Glu | Ser | Ser | Cys | Val | Glu | Ser | Asn |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Ser | Gly | Val | Asp | Phe | Gly | Val | Leu | Gly | Pro | Ser | Thr | Ser | Ser | Arg | Leu |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Lys | Ile | Arg | Ser | Asp | Phe | Arg | Arg | Thr | Ile | Asp | Glu | Asn | Glu | Asp | Pro |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ile | Asp | Gln | Ala | Asp | Asn | Gly | Val | Val | Lys | Phe | Gln | Leu | Thr | Asp | Ala |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Asp | Val | Ser | Ser | Lys | Leu | Cys | Glu | Lys | Gly | Ala | Val | Pro | Leu | Thr | Pro |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Cys | Gly | Glu | Ser | Cys | Ala | Glu | Ser | Ile | Phe | Gln | Ser | Val | Cys | Ser | Phe |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Glu | Glu | Lys | Gly | Leu | Asp | Val | Glu | Glu | Asn | Arg | Leu | Trp | Glu | Phe | Gln |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Leu | Pro | Glu | Leu | Pro | Arg | Asn | Glu | Ile | Asn | Glu | Thr | Phe | Thr | Val | Ser |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Lys | Ser | Asp | Ser | Thr | Ile | Glu | Gln | Trp | Pro | Asn | Ser | Leu | Lys | Phe | Glu |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ser | Asp | Leu | Ala | Cys | Thr | Glu | Gln | Phe | Ser | Tyr | Glu | Asn | Val | Ser | Glu |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Tyr | Ser | Ser | Gln | Ala | Leu | Ser | Glu | Leu | Gln | Ser | Thr | Ile | Leu | Leu | Glu |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Thr | Ser | Asp | Thr | Asp | Cys | Ser | Asp | Tyr | Thr | Pro | Ser | Ile | Phe | Leu | Glu |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Ser | Gly | Ser | Glu | Phe | Ser | Glu | Lys | Ser | Asn | Asp | Asp | Ala | Ala | Pro | Ser |

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

515 520 525

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

530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Ile Glu Gln Ile Asn Lys Tyr Phe Glu Ile Glu Lys  
545 550 555 560

Lys   Leu

```
<210> 3
<211> 1673
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>  
<223> Được gây ra bởi đột biến

```
<220>
<221> mARN
<222> (1) .. (1673)
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1098)
```

|         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <400> 3 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| aug     | aag | ucc | aag | aag | cca | agg | gca | aaU | ccc | aaa | ccc | gaa | ucc | uac | ucu | 48  |
| Met     | Lys | Ser | Lys | Lys | Pro | Arg | Ala | Asn | Pro | Lys | Pro | Glu | Ser | Tyr | Ser |     |
| 1       |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
|         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ccg     | ccg | aag | aag | aag | cuc | cgu | ucu | cag | cuu | cca | cgg | cgc | aga | cgc | ucu | 96  |
| Pro     | Pro | Lys | Lys | Lys | Leu | Arg | Ser | Gln | Leu | Pro | Arg | Arg | Arg | Arg | Ser |     |
|         |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |
|         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| cgg     | auu | ucu | ccu | uuu | uuc | ugc | ucc | uug | gac | ucc | gau | ucc | ccu | gcu | ccu | 144 |
| Arg     | Ile | Ser | Pro | Phe | Phe | Cys | Ser | Leu | Asp | Ser | Asp | Ser | Pro | Ala | Pro |     |
|         |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
|         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ucu     | acc | acc | auu | gcu | uuu | gcu | ucu | ucu | ucc | uuu | gcu | gcc | gcc | gaa | ucc | 192 |
| Ser     | Thr | Thr | Ile | Ala | Phe | Ala | Ser | Ser | Ser | Phe | Ala | Ala | Ala | Glu | Ser |     |
|         | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
|         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| agc     | ucc | acu | ucc | uuc | cac | gca | ggc | gga | ccu | gag | guu | ucu | agc | cag | cuc | 240 |
| Ser     | Ser | Thr | Ser | Phe | His | Ala | Gly | Gly | Pro | Glu | Val | Ser | Ser | Gln | Leu |     |
| 65      |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| aac gcg ugu uuu gga uuc cag agg ccg aau uug cgg aag aga cga uuu | 288 |
| Asn Ala Cys Phe Gly Phe Gln Arg Pro Asn Leu Arg Lys Arg Arg Phe |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| ggu ucg ggu ggu guu aau uug gau gaa guu ucg aag aag gag guu gga | 336 |
| Gly Ser Gly Gly Val Asn Leu Asp Glu Val Ser Lys Lys Glu Val Gly |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| gua ggg agu aau gug gaa gug ucu gaa ucg ucu ugc guu gaa uca aau | 384 |
| Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| ucu gga guu gau uuu ggu guu cuc gga cca agc acu agc ucc agg uug | 432 |
| Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Leu Gly Pro Ser Thr Ser Ser Arg Leu |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| aag auu aga agu gau uuu agg aga acu auu gac gaa aau gaa gau cca | 480 |
| Lys Ile Arg Ser Asp Phe Arg Arg Thr Ile Asp Glu Asn Glu Asp Pro |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
| auc gau caa gcg gau aau gga guu gug aag uuu caa uug acg gau gcu | 528 |
| Ile Asp Gln Ala Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Gln Leu Thr Asp Ala |     |
| 165 170 175                                                     |     |
| gau guc ucg ucg aag cuu ugu gaa aag gga gcu gug cca cuc acu ccu | 576 |
| Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Glu Lys Gly Ala Val Pro Leu Thr Pro |     |
| 180 185 190                                                     |     |
| ugu gga gag ucu ugc gcu gag ucu auc uuc cag agc guu ugu ucg uuc | 624 |
| Cys Gly Glu Ser Cys Ala Glu Ser Ile Phe Gln Ser Val Cys Ser Phe |     |
| 195 200 205                                                     |     |
| gaa gag aaa gga uua gac guu gaa gaa aac aga cua ugg gaa uuu cag | 672 |
| Glu Glu Lys Gly Leu Asp Val Glu Glu Asn Arg Leu Trp Glu Phe Gln |     |
| 210 215 220                                                     |     |
| uua cca gaa cua ccg aga aau gag auc aau gaa acu uuc acu guu ucg | 720 |
| Leu Pro Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ile Asn Glu Thr Phe Thr Val Ser |     |
| 225 230 235 240                                                 |     |
| aag ucg gau ucg acg aua gaa cag ugg ccu aau agc uug aag uuu gaa | 768 |
| Lys Ser Asp Ser Thr Ile Glu Gln Trp Pro Asn Ser Leu Lys Phe Glu |     |
| 245 250 255                                                     |     |
| ucg gau cuu gcu ugc acg gag caa uuc ucu uau gag aau guu ucg gaa | 816 |
| Ser Asp Leu Ala Cys Thr Glu Gln Phe Ser Tyr Glu Asn Val Ser Glu |     |
| 260 265 270                                                     |     |
| uac ucu agc cag gcg uug ucc gag cuu caa uca aca auu cua uug gag | 864 |
| Tyr Ser Ser Gln Ala Leu Ser Glu Leu Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu |     |
| 275 280 285                                                     |     |

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| acg ucu gau acu gac ugc uca gau uac acu ccu uca auu uuu uug gaa<br>Thr Ser Asp Thr Asp Cys Ser Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Phe Leu Glu<br>290 295 300     | 912  |
| ucc gga agc gaa uuu uca gag aaa ucg aac gac gac gca gcu ccu ucg<br>Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Asp Asp Ala Ala Pro Ser<br>305 310 315 320 | 960  |
| uca aca uuu agc aug uug cug cag uac aga cgc gac uuu cua aac uua<br>Ser Thr Phe Ser Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Asn Leu<br>325 330 335     | 1008 |
| aau gcc ucu cca gac auc aga acu agc ucg ucu auu gaa gaa gag aaa<br>Asn Ala Ser Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Ser Ile Glu Glu Glu Lys<br>340 345 350     | 1056 |
| gua gau caa ucu acg aa ugg acg aug aag aag ccu auc uaa<br>Val Asp Gln Ser Thr Asn Trp Thr Met Lys Lys Pro Ile<br>355 360 365                          | 1098 |
| uguucagaag uagagaaaga cgccaauuga uuauucgcga cuacguagag gaguaucggu                                                                                     | 1158 |
| ccacaacgga uuauggcgau cucauucucc agcaacgguc aaaugugguc caauggauag                                                                                     | 1218 |
| uugaacgauc gagagauucc aaacuucalc aggagacgac auuuuuagga guuacccucc                                                                                     | 1278 |
| uggaccagau ucugagcaga ggauucuuca aagcuggaag acaccuucac auucugggca                                                                                     | 1338 |
| uagcaugucu aacuuuggcg acuagaauug aagaaaauca gucauacagc ugguucuacc                                                                                     | 1398 |
| ugaaagcugc uggagcugac ucgaauuugg agaaucgagc uaagaacuuu gcggagcugg                                                                                     | 1458 |
| uucuucacaga caaaguccaa uuuguuuuu ucccuucaac uauugcagcu gcggguuguca                                                                                    | 1518 |
| ucuuggcguc ccuaggagaa aaacaagaug caccaaguca acgagucuuu gagguacaua                                                                                     | 1578 |
| aaauacaaaua ccuguuagag agaaaacucc uuuaucuuua uauugaccca auugaacaaa                                                                                    | 1638 |
| uaaacaagua uuugaaauc gagaagaaac uuuaa                                                                                                                 | 1673 |
| <210> 4                                                                                                                                               |      |
| <211> 365                                                                                                                                             |      |
| <212> PRT                                                                                                                                             |      |
| <213> Trình tự nhân tạo                                                                                                                               |      |
| <220>                                                                                                                                                 |      |
| <223> Cấu trúc tổng hợp                                                                                                                               |      |
| <400> 4                                                                                                                                               |      |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Met | Lys | Ser | Lys | Lys | Pro | Arg | Ala | Asn | Pro | Lys | Pro | Glu | Ser | Tyr | Ser |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
| Pro | Pro | Lys | Lys | Lys | Leu | Arg | Ser | Gln | Leu | Pro | Arg | Arg | Arg | Arg | Ser |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
| Arg | Ile | Ser | Pro | Phe | Phe | Cys | Ser | Leu | Asp | Ser | Asp | Ser | Pro | Ala | Pro |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
| Ser | Thr | Thr | Ile | Ala | Phe | Ala | Ser | Ser | Ser | Phe | Ala | Ala | Ala | Glu | Ser |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| Ser | Ser | Thr | Ser | Phe | His | Ala | Gly | Gly | Pro | Glu | Val | Ser | Ser | Gln | Leu |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Asn | Ala | Cys | Phe | Gly | Phe | Gln | Arg | Pro | Asn | Leu | Arg | Lys | Arg | Arg | Phe |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Gly | Ser | Gly | Gly | Val | Asn | Leu | Asp | Glu | Val | Ser | Lys | Lys | Glu | Val | Gly |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Val | Gly | Ser | Asn | Val | Glu | Val | Ser | Glu | Ser | Ser | Cys | Val | Glu | Ser | Asn |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
| Ser | Gly | Val | Asp | Phe | Gly | Val | Leu | Gly | Pro | Ser | Thr | Ser | Ser | Arg | Leu |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| Lys | Ile | Arg | Ser | Asp | Phe | Arg | Arg | Thr | Ile | Asp | Glu | Asn | Glu | Asp | Pro |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Ile | Asp | Gln | Ala | Asp | Asn | Gly | Val | Val | Lys | Phe | Gln | Leu | Thr | Asp | Ala |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Asp | Val | Ser | Ser | Lys | Leu | Cys | Glu | Lys | Gly | Ala | Val | Pro | Leu | Thr | Pro |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Cys | Gly | Glu | Ser | Cys | Ala | Glu | Ser | Ile | Phe | Gln | Ser | Val | Cys | Ser | Phe |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |

Glu Glu Lys Gly Leu Asp Val Glu Glu Asn Arg Leu Trp Glu Phe Gln  
 210 215 220

Leu Pro Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ile Asn Glu Thr Phe Thr Val Ser  
 225 230 235 240

Lys Ser Asp Ser Thr Ile Glu Gln Trp Pro Asn Ser Leu Lys Phe Glu  
 245 250 255

Ser Asp Leu Ala Cys Thr Glu Gln Phe Ser Tyr Glu Asn Val Ser Glu  
 260 265 270

Tyr Ser Ser Gln Ala Leu Ser Glu Leu Gln Ser Thr Ile Leu Leu Glu  
 275 280 285

Thr Ser Asp Thr Asp Cys Ser Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Phe Leu Glu  
 290 295 300

Ser Gly Ser Glu Phe Ser Glu Lys Ser Asn Asp Asp Ala Ala Pro Ser  
 305 310 315 320

Ser Thr Phe Ser Met Leu Leu Gln Tyr Arg Arg Asp Phe Leu Asn Leu  
 325 330 335

Asn Ala Ser Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Ser Ile Glu Glu Glu Lys  
 340 345 350

Val Asp Gln Ser Thr Asn Trp Thr Met Lys Lys Pro Ile  
 355 360 365

<210> 5  
 <211> 2348  
 <212> ADN  
 <213> Cucumis melo

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (192)..(1925)

<300>  
 <308> GenBank/XM\_008454203.1

&lt;309&gt; 2014-06-25

&lt;313&gt; (1)..(2348)

&lt;400&gt; 5

```

aactgataaa aacattccaa attgagggat caaaatgata ttttacacga aaaggaggag      60
gaggggtggga ccacttcga gagaaacctc aattcgaatt cacattttctc ccttcgcttc      120
tttaacttcc taactgctct gctttccatc acgaaactcc atcttcatct tcctccttaa      180
tcgcaaacac c atg aaa tcc aag aaa cga agg cct aat ccc aac cct caa      230
              Met Lys Ser Lys Lys Arg Arg Pro Asn Pro Asn Pro Gln
              1              5              10

tcc ttc tct cca ccc aag aac aag aag ctc cgt tct cac ctt cca cgc      278
Ser Phe Ser Pro Pro Lys Asn Lys Lys Leu Arg Ser His Leu Pro Arg
      15              20              25

cgc aaa cgc ccg agg att tca cct ttt ctc tgc tct aat ttg gtt tcc      326
Arg Lys Arg Pro Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys Ser Asn Leu Val Ser
      30              35              40              45

cat tcc ccc gct ccc tcc acc acc ttt gct ttg gct gcc gca gaa tcc      374
His Ser Pro Ala Pro Ser Thr Thr Phe Ala Leu Ala Ala Ala Glu Ser
              50              55              60

acc tcc act tcc ttc tac aca tcc cga cct gac gtt tct agc cac ctc      422
Thr Ser Thr Ser Phe Tyr Thr Ser Arg Pro Asp Val Ser Ser His Leu
              65              70              75

agc gct ccc aat ttc agg aag aga cga ttt gat tcc aag aag gag gtt      470
Ser Ala Pro Asn Phe Arg Lys Arg Arg Phe Asp Ser Lys Lys Glu Val
      80              85              90

gga gta ggg agt aat gtg gaa gtg tct gaa tct tct tgt gtt gaa tct      518
Gly Val Gly Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser
      95              100              105

aat tct gga gtt gat ttt ggt gtt tcc gga cca agc act act tcg aag      566
Asn Ser Gly Val Asp Phe Gly Val Ser Gly Pro Ser Thr Thr Ser Lys
      110              115              120              125

tta aag aat agg agt agt ttt agg aca act att aac gga aat gaa gat      614
Leu Lys Asn Arg Ser Ser Phe Arg Thr Thr Ile Asn Gly Asn Glu Asp
              130              135              140

caa att gat cca gcg gag aat gga gtt gag aag ttc gaa ttc acg gat      662
Gln Ile Asp Pro Ala Glu Asn Gly Val Glu Lys Phe Glu Phe Thr Asp
              145              150              155

gtt gat gtc tcg tcg aag ctt tgt gga aag gaa gct gtg gta ctc act      710
Val Asp Val Ser Ser Lys Leu Cys Gly Lys Glu Ala Val Val Leu Thr

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 160 |     |     |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     |     |     |      |
| tct | tgt | gta | gag | tct | tgt | gct | gaa | tct | atc | ttt | cag | agt | gtt | tgt | cgc | 758  |
| Ser | Cys | Val | Glu | Ser | Cys | Ala | Glu | Ser | Ile | Phe | Gln | Ser | Val | Cys | Pro |      |
| 175 |     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     |     |     |      |
| ttc | gaa | gag | aaa | cga | tta | gaa | gtt | gaa | gat | aac | aga | cta | tgg | gaa | ttt | 806  |
| Phe | Glu | Glu | Lys | Arg | Leu | Glu | Val | Glu | Asp | Asn | Arg | Leu | Trp | Glu | Phe |      |
| 190 |     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |      |
| cag | tta | cct | gag | cta | ccg | aga | aat | gag | att | aat | gaa | act | ttc | act | gtt | 854  |
| Gln | Leu | Pro | Glu | Leu | Pro | Arg | Asn | Glu | Ile | Asn | Glu | Thr | Phe | Thr | Val |      |
| 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |      |
| tcg | aag | tcg | gat | tcg | acg | ata | gaa | cag | tgg | cct | ggc | agc | ttg | aag | ttt | 902  |
| Ser | Lys | Ser | Asp | Ser | Thr | Ile | Glu | Gln | Trp | Pro | Gly | Ser | Leu | Lys | Phe |      |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |     |     |     |     |      |
| gaa | tcg | gat | ctt | gct | tgc | acg | gag | caa | ttc | tct | tac | gat | gat | gtt | tcg | 950  |
| Glu | Ser | Asp | Leu | Ala | Cys | Thr | Glu | Gln | Phe | Ser | Tyr | Asp | Asp | Val | Ser |      |
| 240 |     |     |     | 245 |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     |     |     |      |
| gaa | tac | tct | agc | cag | gcg | ttg | tcg | ctt | cag | tca | act | att | cta | ttg | gag | 998  |
| Glu | Tyr | Ser | Ser | Gln | Ala | Leu | Ser | Leu | Gln | Ser | Thr | Ile | Leu | Leu | Glu |      |
| 255 |     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     |     |     |      |
| act | tct | gat | gag | tac | tgc | tca | gat | tac | act | cca | tca | att | ttc | ttg | gaa | 1046 |
| Thr | Ser | Asp | Glu | Tyr | Cys | Ser | Asp | Tyr | Thr | Pro | Ser | Ile | Phe | Leu | Glu |      |
| 270 |     |     |     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |      |
| tcc | gga | agc | gaa | ttt | tca | gag | aaa | tcg | aac | gaa | gac | gca | gct | cct | tca | 1094 |
| Ser | Gly | Ser | Glu | Phe | Ser | Glu | Lys | Ser | Asn | Glu | Asp | Ala | Ala | Pro | Ser |      |
| 290 |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |     |     |      |
| tcg | aca | ttt | aga | atg | ttg | ctg | cag | tac | aga | cgc | gac | ttt | cta | agc | tta | 1142 |
| Ser | Thr | Phe | Arg | Met | Leu | Leu | Gln | Tyr | Arg | Arg | Asp | Phe | Leu | Ser | Leu |      |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     |     |     |     |     |      |
| aat | tcc | tct | cca | gac | atc | aga | act | agc | tcg | cct | att | gaa | gaa | gaa | aaa | 1190 |
| Asn | Ser | Ser | Pro | Asp | Ile | Arg | Thr | Ser | Ser | Pro | Ile | Glu | Glu | Glu | Lys |      |
| 320 |     |     |     | 325 |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     |     |     |      |
| gta | gat | caa | tct | acg | att | ctg | aga | ttt | gaa | gaa | ttg | gac | gac | gaa | gaa | 1238 |
| Val | Asp | Gln | Ser | Thr | Ile | Leu | Arg | Phe | Glu | Glu | Leu | Asp | Asp | Glu | Glu |      |
| 335 |     |     |     | 340 |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     |     |     |      |
| gcc | tat | cga | atg | ttc | aga | aat | aga | gaa | aga | cgc | caa | ttg | att | att | cac | 1286 |
| Ala | Tyr | Arg | Met | Phe | Arg | Asn | Arg | Glu | Arg | Arg | Gln | Leu | Ile | Ile | His |      |
| 350 |     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     | 365 |     |     |     |      |
| gac | tac | ata | gag | gag | tat | cga | tcc | aca | acg | gat | tat | ggc | gat | ctc | att | 1334 |
| Asp | Tyr | Ile | Glu | Glu | Tyr | Arg | Ser | Thr | Thr | Asp | Tyr | Gly | Asp | Leu | Ile |      |

|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-------|-------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|-------|--|
|     |     |     |     | 370 |         |     |       | 375   |            |            |     | 380 |     |     |     |     |  |  |       |  |
| ctt | cag | caa | cgg | tca | aat     | atg | gtc   | caa   | tgg        | ata        | gtt | gaa | cga | tct | aga |     |  |  | 1382  |  |
| Leu | Gln | Gln | Arg | Ser | Asn     | Met | Val   | Gln   | Trp        | Ile        | Val | Glu | Arg | Ser | Arg |     |  |  |       |  |
| 385 |     |     |     |     |         |     |       | 390   |            |            |     | 395 |     |     |     |     |  |  |       |  |
|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
| gaa | aac | aaa | ctt | cat | cag     | gag | acg   | aca   | ttt        | tta        | gga | gtt | acc | ctt | cta |     |  |  | 1430  |  |
| Glu | Asn | Lys | Leu | His | Gln     | Glu | Thr   | Thr   | Phe        | Leu        | Gly | Val | Thr | Leu | Leu |     |  |  |       |  |
| 400 |     |     |     |     |         |     |       | 405   |            |            |     | 410 |     |     |     |     |  |  |       |  |
|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
| gac | cag | att | ctg | agc | aaa     | gga | ttc   | ttc   | aaa        | gct        | gaa | agt | cgc | ctt | caa |     |  |  | 1478  |  |
| Asp | Gln | Ile | Leu | Ser | Lys     | Gly | Phe   | Phe   | Lys        | Ala        | Glu | Ser | Arg | Leu | Gln |     |  |  |       |  |
| 415 |     |     |     |     |         |     |       | 420   |            |            |     | 425 |     |     |     |     |  |  |       |  |
|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
| att | cta | ggc | ata | gca | tgt     | cta | act   | ttg   | gcg        | act        | aga | att | gaa | gaa | aat |     |  |  | 1526  |  |
| Ile | Leu | Gly | Ile | Ala | Cys     | Leu | Thr   | Leu   | Ala        | Thr        | Arg | Ile | Glu | Glu | Asn |     |  |  |       |  |
| 430 |     |     |     |     |         |     |       | 435   |            |            |     | 440 |     |     |     | 445 |  |  |       |  |
|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
| cag | tca | tac | agc | tgg | tta     | cag | caa   | agg   | aat        | atc        | cat | gta | ggg | agc | aac |     |  |  | 1574  |  |
| Gln | Ser | Tyr | Ser | Trp | Leu     | Gln | Gln   | Arg   | Asn        | Ile        | His | Val | Gly | Ser | Asn |     |  |  |       |  |
| 450 |     |     |     |     |         |     |       | 455   |            |            |     | 460 |     |     |     |     |  |  |       |  |
|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
| acg | tac | aga | aga | gca | gaa     | gtt | gtt   | ggc   | atg        | gaa        | tgg | ctt | gtt | gaa | gaa |     |  |  | 1622  |  |
| Thr | Tyr | Arg | Arg | Ala | Glu     | Val | Val   | Gly   | Met        | Glu        | Trp | Leu | Val | Glu | Glu |     |  |  |       |  |
| 465 |     |     |     |     |         |     |       | 470   |            |            |     | 475 |     |     |     |     |  |  |       |  |
|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
| gtt | ctt | aag | ttc | cat | tgt     | ttc | ttg   | cca   | act        | gtt        | tac | aac | ttc | ttg | tgg |     |  |  | 1670  |  |
| Val | Leu | Lys | Phe | His | Cys     | Phe | Leu   | Pro   | Thr        | Val        | Tyr | Asn | Phe | Leu | Trp |     |  |  |       |  |
| 480 |     |     |     |     |         |     |       | 485   |            |            |     | 490 |     |     |     |     |  |  |       |  |
|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
| ttc | tac | ctg | aaa | gct | gct     | gga | gct   | aac   | tca        | gat        | ttg | gag | aat | cga | gct |     |  |  | 1718  |  |
| Phe | Tyr | Leu | Lys | Ala | Ala     | Gly | Ala   | Asn   | Ser        | Asp        | Leu | Glu | Asn | Arg | Ala |     |  |  |       |  |
| 495 |     |     |     |     |         |     |       | 500   |            |            |     | 505 |     |     |     |     |  |  |       |  |
|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
| aag | aat | ttc | gca | gtg | ctc     | gtt | ctt   | gca   | gac        | aaa        | gtc | caa | ttt | tgt | tat |     |  |  | 1766  |  |
| Lys | Asn | Phe | Ala | Val | Leu     | Val | Leu   | Ala   | Asp        | Lys        | Val | Gln | Phe | Cys | Tyr |     |  |  |       |  |
| 510 |     |     |     |     |         |     |       | 515   |            |            |     | 520 |     |     |     | 525 |  |  |       |  |
|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
| ttc | cct | tca | aca | att | gca     | gct | gca   | gtt   | gtc        | atc        | ttg | gcg | tcc | tta | gga |     |  |  | 1814  |  |
| Phe | Pro | Ser | Thr | Ile | Ala     | Ala | Ala   | Val   | Val        | Ile        | Leu | Ala | Ser | Leu | Gly |     |  |  |       |  |
| 530 |     |     |     |     |         |     |       | 535   |            |            |     | 540 |     |     |     |     |  |  |       |  |
|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
| gaa | aaa | caa | gat | gca | cca     | agt | caa   | cga   | gtc        | att        | gag | aca | cat | gtc | aga |     |  |  | 1862  |  |
| Glu | Lys | Gln | Asp | Ala | Pro     | Ser | Gln   | Arg   | Val        | Ile        | Glu | Thr | His | Val | Arg |     |  |  |       |  |
| 545 |     |     |     |     |         |     |       | 550   |            |            |     | 555 |     |     |     |     |  |  |       |  |
|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
| aca | gaa | aac | gac | gat | ctg     | cct | gaa   | tgt   | atc        | gag        | agc | ttg | gag | tgg | cta |     |  |  | 1910  |  |
| Thr | Glu | Asn | Asp | Asp | Leu     | Pro | Glu   | Cys   | Ile        | Glu        | Ser | Leu | Glu | Trp | Leu |     |  |  |       |  |
| 560 |     |     |     |     |         |     |       | 565   |            |            |     | 570 |     |     |     |     |  |  |       |  |
|     |     |     |     |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  |       |  |
| tta | aag | ctt | tta | tga | tggaagc | atc | aaatc | ctaac | acagcaaaaa | agaaagcaag |     |     |     |     |     |     |  |  | 1965  |  |
| Leu | Lys | Leu | Leu |     |         |     |       |       |            |            |     |     |     |     |     |     |  |  | </td> |  |

575

```

caattggtct ttttgacata ttcttgacca cttaaaccatc atcttgaaca cagctagtga      2025
agctcaccct ccgaaaccag ctatataggt aagacattca tcaattcagt tctcttctat      2085
tctatcacca acagaatgaa aatttggttt ttcttttcaa attttattat aacaagagat      2145
tgaatcagga cctagtcaag tccaaaacca aatagtatatt gatgttcatt tacatgcttt      2205
cataatttca tgtatttagt agtggtgaat tacaggatgt atgtaattga tactcagacc      2265
taatgactct atattcttca ccaaaacaaa caatgggttac gatgagattt tcaataactcg      2325
agcaattgaa gcttaaaatg taa                                              2348

```

```

<210> 6
<211> 577
<212> PRT
<213> Cucumis melo

```

&lt;400&gt; 6

```

Met Lys Ser Lys Lys Arg Arg Pro Asn Pro Asn Pro Gln Ser Phe Ser
1          5          10          15

```

```

Pro Pro Lys Asn Lys Lys Leu Arg Ser His Leu Pro Arg Arg Lys Arg
          20          25          30

```

```

Pro Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys Ser Asn Leu Val Ser His Ser Pro
          35          40          45

```

```

Ala Pro Ser Thr Thr Phe Ala Leu Ala Ala Ala Glu Ser Thr Ser Thr
          50          55          60

```

```

Ser Phe Tyr Thr Ser Arg Pro Asp Val Ser Ser His Leu Ser Ala Pro
65          70          75          80

```

```

Asn Phe Arg Lys Arg Arg Phe Asp Ser Lys Lys Glu Val Gly Val Gly
          85          90          95

```

```

Ser Asn Val Glu Val Ser Glu Ser Ser Cys Val Glu Ser Asn Ser Gly
          100          105          110

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Asp | Phe | Gly | Val | Ser | Gly | Pro | Ser | Thr | Thr | Ser | Lys | Leu | Lys | Asn | 115 | 120 | 125 |
| Arg | Ser | Ser | Phe | Arg | Thr | Thr | Ile | Asn | Gly | Asn | Glu | Asp | Gln | Ile | Asp | 130 | 135 | 140 |
| Pro | Ala | Glu | Asn | Gly | Val | Glu | Lys | Phe | Glu | Phe | Thr | Asp | Val | Asp | Val | 145 | 150 | 155 |
| Ser | Ser | Lys | Leu | Cys | Gly | Lys | Glu | Ala | Val | Val | Leu | Thr | Ser | Cys | Val | 165 | 170 | 175 |
| Glu | Ser | Cys | Ala | Glu | Ser | Ile | Phe | Gln | Ser | Val | Cys | Pro | Phe | Glu | Glu | 180 | 185 | 190 |
| Lys | Arg | Leu | Glu | Val | Glu | Asp | Asn | Arg | Leu | Trp | Glu | Phe | Gln | Leu | Pro | 195 | 200 | 205 |
| Glu | Leu | Pro | Arg | Asn | Glu | Ile | Asn | Glu | Thr | Phe | Thr | Val | Ser | Lys | Ser | 210 | 215 | 220 |
| Asp | Ser | Thr | Ile | Glu | Gln | Trp | Pro | Gly | Ser | Leu | Lys | Phe | Glu | Ser | Asp | 225 | 230 | 235 |
| Leu | Ala | Cys | Thr | Glu | Gln | Phe | Ser | Tyr | Asp | Asp | Val | Ser | Glu | Tyr | Ser | 245 | 250 | 255 |
| Ser | Gln | Ala | Leu | Ser | Leu | Gln | Ser | Thr | Ile | Leu | Leu | Glu | Thr | Ser | Asp | 260 | 265 | 270 |
| Glu | Tyr | Cys | Ser | Asp | Tyr | Thr | Pro | Ser | Ile | Phe | Leu | Glu | Ser | Gly | Ser | 275 | 280 | 285 |
| Glu | Phe | Ser | Glu | Lys | Ser | Asn | Glu | Asp | Ala | Ala | Pro | Ser | Ser | Thr | Phe | 290 | 295 | 300 |
| Arg | Met | Leu | Leu | Gln | Tyr | Arg | Arg | Asp | Phe | Leu | Ser | Leu | Asn | Ser | Ser | 305 | 310 | 315 |

Pro Asp Ile Arg Thr Ser Ser Pro Ile Glu Glu Glu Lys Val Asp Gln  
325 330 335

Ser Thr Ile Leu Arg Phe Glu Glu Leu Asp Asp Glu Glu Ala Tyr Arg  
340 345 350

Met Phe Arg Asn Arg Glu Arg Arg Gln Leu Ile Ile His Asp Tyr Ile  
355 360 365

Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Leu Ile Leu Gln Gln  
370 375 380

Arg Ser Asn Met Val Gln Trp Ile Val Glu Arg Ser Arg Glu Asn Lys  
385 390 395 400

Leu His Gln Glu Thr Thr Phe Leu Gly Val Thr Leu Leu Asp Gln Ile  
405 410 415

Leu Ser Lys Gly Phe Phe Lys Ala Glu Ser Arg Leu Gln Ile Leu Gly  
420 425 430

Ile Ala Cys Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ile Glu Glu Asn Gln Ser Tyr  
435 440 445

Ser Trp Leu Gln Gln Arg Asn Ile His Val Gly Ser Asn Thr Tyr Arg  
450 455 460

Arg Ala Glu Val Val Gly Met Glu Trp Leu Val Glu Glu Val Leu Lys  
465 470 475 480

Phe His Cys Phe Leu Pro Thr Val Tyr Asn Phe Leu Trp Phe Tyr Leu  
485 490 495

Lys Ala Ala Gly Ala Asn Ser Asp Leu Glu Asn Arg Ala Lys Asn Phe  
500 505 510

Ala Val Leu Val Leu Ala Asp Lys Val Gln Phe Cys Tyr Phe Pro Ser  
515 520 525

Thr Ile Ala Ala Ala Val Val Ile Leu Ala Ser Leu Gly Glu Lys Gln  
 530 535 540

Asp Ala Pro Ser Gln Arg Val Ile Glu Thr His Val Arg Thr Glu Asn  
 545 550 555 560

Asp Asp Leu Pro Glu Cys Ile Glu Ser Leu Glu Trp Leu Leu Lys Leu  
 565 570 575

Leu

<210> 7  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Đoạn mỗi

<400> 7  
 gtaaaacgac ggccagttgc ctctccagac atcagaac

38

<210> 8  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Đoạn mỗi

<400> 8  
 caggaaacag ctatgaccaa tccgttgtgg accgatac

38

<210> 9  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Đoạn mỗi

<400> 9  
 gtaaaacgac ggccagtgct ccttcgtcaa catttagc

38

<210> 10  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Đoạn mỗi

<400> 10  
 caggaaacag ctatgacctt ggcgtctttc tctacttctg

40

<210> 11  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Đoạn mỗi

<400> 11  
 caggaaacag ctatgaccct ggtccaggag ggtaactc

38

<210> 12  
 <211> 569  
 <212> PRT  
 <213> Cucumis sativus

<400> 12

Met Lys Ser Lys Lys Arg Arg Pro Asn Pro Lys Pro Gln Ser Phe Ser  
 1 5 10 15

Pro Pro Lys Asn Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Lys Arg  
 20 25 30

Pro Leu Ile Leu Pro Phe Phe Cys Cys Tyr Leu Asp Ser Asp Ser Pro  
 35 40 45

Pro Pro Ser Thr Thr Phe Ser Phe Ala Ser Ser Ser Ser Phe Thr Ala  
 50 55 60

Ala Gln Ser Thr Ser Thr Ser Phe Phe Pro Thr Gly Pro Glu Val Ser  
 65 70 75 80

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

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

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

500

505

510

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

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

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

Ser Leu Glu Trp Leu Leu Lys Phe Leu  
 565

<210> 13  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> nhân tạo

<220>  
 <223> trình tự của mẫu 114 và 115 của Fig. 2

<400> 13  
 acgattttga gatttgaaga attggacgat gaagaagcct atctaattgtt

50

<210> 14  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> nhân tạo

<220>  
 <223> trình tự của mẫu 114 và 115 của Fig. 2

<400> 14

Thr Ile Leu Arg Phe Glu Glu Leu Asp Asp Glu Glu Ala Tyr Leu Met  
 1 5 10 15

Phe

<210> 15  
 <211> 34  
 <212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> trình tự của mẫu 116 và 117 của Fig. 2

<400> 15

acgaattgga cgatgaagaa gcctatctaa tgtt

34

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> trình tự của mẫu 116 và 117 của Fig. 2

<400> 16

Thr Asn Trp Thr Met Lys Lys Pro Ile

1

5

<210> 17

<211> 1689

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> Citrullus lanatus - cADN của gen tương tự xyclin SDS chứa đột biến C thành T của nucleotit 670 tạo thành codon kết thúc

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(672)

<400> 17

atg aag tcc aag aag cca agg gca aat ccc aaa ccc gaa tcc tac tct  
Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser  
1 5 10 15

48

ccg ccg aag aag aag ctc cgt tct cag ctt cca cgg cgc aga cgc tct  
Pro Pro Lys Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Ser  
20 25 30

96

cgg att tct cct ttt ttc tgc tcc ttg gac tcc gat tcc cct gct cct  
Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro  
35 40 45

144

tct acc acc att gct ttt gct tct tct tcc ttt gct gcc gcc gaa tcc  
Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser

192

|                                                                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|-----|
| 50                                                                |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     | 60  |     |     |     |  |  |  |     |
| agc                                                               | tcc | act | tcc | ttc | cac | gca | ggc | gga | cct | gag | gtt | tct | agc | cag | ctc |  |  |  | 240 |
| Ser                                                               | Ser | Thr | Ser | Phe | His | Ala | Gly | Gly | Pro | Glu | Val | Ser | Ser | Gln | Leu |  |  |  |     |
| 65                                                                |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |  |     |
| aac                                                               | gcg | tgt | ttt | gga | ttc | cag | agg | ccg | aat | ttg | cg  | aag | aga | cga | ttt |  |  |  | 288 |
| Asn                                                               | Ala | Cys | Phe | Gly | Phe | Gln | Arg | Pro | Asn | Leu | Arg | Lys | Arg | Arg | Phe |  |  |  |     |
|                                                                   |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |  |     |
| ggt                                                               | tcg | ggt | ggt | gtt | aat | ttg | gat | gaa | gtt | tcg | aag | aag | gag | gtt | gga |  |  |  | 336 |
| Gly                                                               | Ser | Gly | Gly | Val | Asn | Leu | Asp | Glu | Val | Ser | Lys | Lys | Glu | Val | Gly |  |  |  |     |
|                                                                   |     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |  |     |
| gta                                                               | ggg | agt | aat | gtg | gaa | gtg | tct | gaa | tcg | tct | tgc | gtt | gaa | tca | aat |  |  |  | 384 |
| Val                                                               | Gly | Ser | Asn | Val | Glu | Val | Ser | Glu | Ser | Ser | Cys | Val | Glu | Ser | Asn |  |  |  |     |
|                                                                   |     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |  |     |
| tct                                                               | gga | gtt | gat | ttt | ggt | gtt | ctc | gga | cca | agc | act | agc | tcc | agg | ttg |  |  |  | 432 |
| Ser                                                               | Gly | Val | Asp | Phe | Gly | Val | Leu | Gly | Pro | Ser | Thr | Ser | Ser | Arg | Leu |  |  |  |     |
|                                                                   |     |     |     | 130 |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |  |  |  |     |
| aag                                                               | att | aga | agt | gat | ttt | agg | aga | act | att | gac | gaa | aat | gaa | gat | cca |  |  |  | 480 |
| Lys                                                               | Ile | Arg | Ser | Asp | Phe | Arg | Arg | Thr | Ile | Asp | Glu | Asn | Glu | Asp | Pro |  |  |  |     |
| 145                                                               |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |  |     |
| atc                                                               | gat | caa | gcg | gat | aat | gga | gtt | gtg | aag | ttt | caa | ttg | acg | gat | gct |  |  |  | 528 |
| Ile                                                               | Asp | Gln | Ala | Asp | Asn | Gly | Val | Val | Lys | Phe | Gln | Leu | Thr | Asp | Ala |  |  |  |     |
|                                                                   |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |  |     |
| gat                                                               | gtc | tcg | tcg | aag | ctt | tgt | gaa | aag | gga | gct | gtg | cca | ctc | act | cct |  |  |  | 576 |
| Asp                                                               | Val | Ser | Ser | Lys | Leu | Cys | Glu | Lys | Gly | Ala | Val | Pro | Leu | Thr | Pro |  |  |  |     |
|                                                                   |     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |  |     |
| tgt                                                               | gga | gag | tct | tgc | gct | gag | tct | atc | ttc | cag | agc | gtt | tgt | tcg | ttc |  |  |  | 624 |
| Cys                                                               | Gly | Glu | Ser | Cys | Ala | Glu | Ser | Ile | Phe | Gln | Ser | Val | Cys | Ser | Phe |  |  |  |     |
|                                                                   |     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |  |     |
| gaa                                                               | gag | aaa | gga | tta | gac | gtt | gaa | gaa | aac | aga | cta | tgg | gaa | ttt | tag |  |  |  | 672 |
| Glu                                                               | Glu | Lys | Gly | Leu | Asp | Val | Glu | Glu | Asn | Arg | Leu | Trp | Glu | Phe |     |  |  |  |     |
|                                                                   |     |     |     | 210 |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |  |     |
| ttaccagaac taccgagaaa tgagatcaat gaaactttca ctgtttcgaa gtcggattcg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  | 732 |
| acgatagaac agtggcctaa tagcttgaag tttgaatcgg atcttgcttg cacggagcaa |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  | 792 |
| ttctcttatg agaatgtttc ggaatactct agccaggcgt tgtccgagct tcaatcaaca |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  | 852 |
| attctattgg agacgtctga tactgactgc tcagattaca ctcttcaat ttttttggaa  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  | 912 |
| tccggaagcg aattttcaga gaaatcgaac gacgacgcag ctcttcgctc aacatttagc |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  | 972 |

atgttgctgc agtacagacg cgacttttcta aacttaaagt cctctccaga catcagaact 1032  
 agctcgtcta ttgaagaaga gaaagtagat caatctacga ttttgagatt tgaagaattg 1092  
 gacgatgaag aagcctatct aatgttcaga agtagagaaa gacgcccaatt gattattcgc 1152  
 gactacgtag aggagtatcg gtccacaacg gattatggcg atctcattct ccagcaacgg 1212  
 tcaaatgtgg tccaatggat agttgaacga tcgagagatt ccaaacttca tcaggagacg 1272  
 acatttttag gagttaccct cctggaccag attctgagca gaggattctt caaagctgga 1332  
 agacaccttc aaattctggg catagcatgt ctaactttgg cgactagaat tgaagaaaat 1392  
 cagtcataca gctgggttcta cctgaaagct gctggagctg actcgaattt ggagaatcga 1452  
 gctaagaact ttgcggagct ggttctttca gacaaagtc aattttgtta tttcccttca 1512  
 actattgcag ctgcggttgt catcttggcg tccctaggag aaaaacaaga tgcaccaagt 1572  
 caacgagtca ttgaggtaca taaatacaaa tacctgttag agagaaaact cctttatctt 1632  
 tatattgacc caattgaaca aataaacaag tattttgaaa tcgagaagaa actttaa 1689

<210> 18  
 <211> 223  
 <212> PRT  
 <213> nhân tạo

<220>  
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 18

Met Lys Ser Lys Lys Pro Arg Ala Asn Pro Lys Pro Glu Ser Tyr Ser  
 1 5 10 15

Pro Pro Lys Lys Lys Leu Arg Ser Gln Leu Pro Arg Arg Arg Arg Ser  
 20 25 30

Arg Ile Ser Pro Phe Phe Cys Ser Leu Asp Ser Asp Ser Pro Ala Pro  
 35 40 45

Ser Thr Thr Ile Ala Phe Ala Ser Ser Ser Phe Ala Ala Ala Glu Ser  
 50 55 60

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

|            |            |     |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 65         |            |     |            |            | 70         |            |            |            |            | 75         |            |            |            |            | 80         |
| Asn        | Ala        | Cys | Phe        | Gly<br>85  | Phe        | Gln        | Arg        | Pro        | Asn<br>90  | Leu        | Arg        | Lys        | Arg        | Arg        | Phe        |
| Gly        | Ser        | Gly | Gly<br>100 | Val        | Asn        | Leu        | Asp        | Glu<br>105 | Val        | Ser        | Lys        | Lys        | Glu<br>110 | Val        | Gly        |
| Val        | Gly<br>115 | Ser | Asn        | Val        | Glu        | Val        | Ser<br>120 | Glu        | Ser        | Ser        | Cys        | Val<br>125 | Glu        | Ser        | Asn        |
| Ser        | Gly<br>130 | Val | Asp        | Phe        | Gly        | Val<br>135 | Leu        | Gly        | Pro        | Ser        | Thr<br>140 | Ser        | Ser        | Arg        | Leu        |
| Lys<br>145 | Ile        | Arg | Ser        | Asp        | Phe<br>150 | Arg        | Arg        | Thr        | Ile        | Asp<br>155 | Glu        | Asn        | Glu        | Asp        | Pro<br>160 |
| Ile        | Asp        | Gln | Ala        | Asp<br>165 | Asn        | Gly        | Val        | Val        | Lys<br>170 | Phe        | Gln        | Leu        | Thr        | Asp<br>175 | Ala        |
| Asp        | Val        | Ser | Ser<br>180 | Lys        | Leu        | Cys        | Glu        | Lys<br>185 | Gly        | Ala        | Val        | Pro        | Leu<br>190 | Thr        | Pro        |
| Cys        | Gly<br>195 | Glu | Ser        | Cys        | Ala        | Glu        | Ser<br>200 | Ile        | Phe        | Gln        | Ser        | Val<br>205 | Cys        | Ser        | Phe        |
| Glu<br>210 | Glu        | Lys | Gly        | Leu        | Asp        | Val<br>215 | Glu        | Glu        | Asn        | Arg        | Leu<br>220 | Trp        | Glu        | Phe        |            |

|       |          |
|-------|----------|
| <210> | 19       |
| <211> | 590      |
| <212> | PRT      |
| <213> | nhân tạo |

<220>  
<223> Solanum lycopersicum

<400> 19

Met Lys Arg Lys Leu His Ala Glu Ala Val Gln Pro Ala Val Gln Gln  
1 5 10 15

Pro Lys Glu Ile Leu Pro Ala Val Lys Arg Gln Leu Arg Ser Lys Leu  
20 25 30

Pro Arg Arg Lys Arg Ser His Ile Ser Pro Ile Leu Arg Ser Phe Ser  
35 40 45

Ile Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Ser Glu Val Ser Arg Gln Ser Ser  
50 55 60

Lys Gly Ser Val Asn Lys Glu Val Lys Lys Arg Glu Ile Glu Gly Glu  
65 70 75 80

Glu Phe Arg Arg Ile Thr Arg Ala Tyr Phe Arg Lys Lys Leu Leu Val  
85 90 95

Asp Gln Lys Lys Asp Ser Glu Val Glu Leu Ser Glu Cys Ser Cys Val  
100 105 110

Asp Ser Cys Ser Glu Val Ile Gly Lys Ile Ile Lys Ile Glu Asp Pro  
115 120 125

Val Asp Ile Ser Arg Asp Ile Val Ser Lys Arg Asn Arg Asn Ala Lys  
130 135 140

Val Ile Glu Gly Thr Glu Asp Ser Glu Val Ile Ser Arg Phe Leu Lys  
145 150 155 160

Ala Ser Gly Gly Phe Cys Gly Glu Ser Ser Lys Ser Gly Glu Asp Ala  
165 170 175

Val Ala Arg Ser Arg Asn Ala Ala Lys Ile Ile His Glu Asp Val Val  
180 185 190

Ser Phe Asn Ser Val Leu Gln Ser Pro Ser Glu Ser Lys Cys Gly Asn  
195 200 205

Leu Ser Val Gln Ser Ile Lys Cys Ser Glu Asn Arg Ala Ala Glu Glu  
210 215 220

Val Glu Ser Glu Val Ser Arg Val Cys Pro Glu Val Glu Leu Ser Ala  
225 230 235 240

Val Glu Gln Ala His Glu Lys Leu Val Glu Ala Glu Leu Asp Leu Glu  
245 250 255

Cys Ser Glu Asn Phe Ser Ile Val Asp Val Ser Asp Asp Tyr Ser Ser  
260 265 270

Ala Tyr Ser Glu Leu Gln Ser Glu Ile Phe Pro Glu Ser Ser Asp Ile  
275 280 285

Asp Ile Ser Asp Tyr Ser Pro Ser Tyr Trp Tyr Asp Ser Gly Ser Gln  
290 295 300

Phe Ser Glu Lys Ser Asn Ala Asp Ala Ser Pro Ser Pro Thr Phe Thr  
305 310 315 320

Leu Phe Leu Arg Phe Gly Gln Gln Phe Cys Arg Ser Thr Ala Ala Leu  
325 330 335

Gln Ser Thr Pro Ile Asn Ser Ser Glu Asp Gln Ile Ser Thr Glu Phe  
340 345 350

Thr Gly Leu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Ser Tyr Arg Met Ile Arg  
355 360 365

Asn Arg Glu Arg Arg Gln Leu Tyr Leu His Asp Tyr Ala Glu Glu Tyr  
370 375 380

Cys Ser Thr Thr Asp Tyr Gly Asp Leu Ile Val Gln Gln Arg Leu Gln  
385 390 395 400

Met Val His Trp Ile Leu Glu Gln Ala Thr Arg Lys Asp Leu Gln Lys  
405 410 415

Glu Thr Met Phe Leu Ser Val Asn Leu Phe Asp Arg Phe Leu Ser Lys  
420 425 430

Gly Tyr Phe Lys Thr Lys Arg Cys Leu Gln Ile Ala Gly Ile Ala Cys  
 435 440 445

Leu Thr Leu Ala Val Arg Ile Glu Glu Asn Gln Pro Phe Asn Ser Ile  
 450 455 460

Arg Gln Lys Thr Phe Ser Val Ala Gly Thr Thr Tyr Ser Cys Ser Glu  
 465 470 475 480

Val Val Ala Met Glu Trp Leu Val Gln Glu Val Leu Asn Phe Gln Cys  
 485 490 495

Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Asn Phe Leu Trp Phe Tyr Leu Lys Ala Ala  
 500 505 510

Thr Ala Thr Glu Tyr Met Glu Lys Thr Ala Lys Tyr Leu Ala Val Leu  
 515 520 525

Ala Leu Leu Gly His Glu His Leu Cys Tyr Arg Pro Ser Thr Val Ala  
 530 535 540

Ser Ala Leu Val Ile Leu Ala Leu Ser Ala Ala Asn Leu Tyr Ala Ser  
 545 550 555 560

Cys His Leu Val Thr Lys Thr His Ala Lys Ile Glu Asp Glu Asp Leu  
 565 570 575

Pro Glu Cys Ile Lys Ser Leu Glu Trp Leu Val Lys Tyr Ile  
 580 585 590

<210> 20

<211> 560

<212> PRT

<213> Capsicum annuum

<400> 20

Met Lys Arg Asn Leu His Ala Glu Ala Ala Glu Ile Leu Pro Ala Met  
 1 5 10 15

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

Leu Glu Cys Ser Glu Asn Phe Ser Val Leu Asp Val Thr Ala Asp Tyr  
 225 230 235 240

Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Leu Gln Ser Glu Ile Phe Pro Glu Ser Ser  
 245 250 255

Asp Phe Asp Leu Ser Asp Tyr Ser Pro Ser Tyr Trp Tyr Asp Ser Gly  
 260 265 270

Ser Gln Phe Ser Glu Lys Ser Asn Gly Asp Ala Thr Pro Ser Pro Thr  
 275 280 285

Leu Thr Leu Phe Leu Arg Phe Ser Gln Gln Phe Cys Arg Ser Thr Ala  
 290 295 300

Ala Leu Gln Phe Thr Ser Val Asn Ser Ser Glu Asp His Ile Ser Thr  
 305 310 315 320

Glu Ile Thr Gly Leu Lys Asp Glu Glu Asp Glu Glu Ser Tyr Met Leu  
 325 330 335

Ile Arg Asn Arg Glu Arg Arg Gln Leu Tyr Leu His Asp Tyr Ala Glu  
 340 345 350

Glu Tyr Cys Ser Thr Thr Asp Ser Gly Asp Leu Ile Val Gln Gln Arg  
 355 360 365

Leu Leu Met Val His Trp Ile Leu Glu Gln Ala Thr Arg Lys Asp Leu  
 370 375 380

Leu Lys Glu Thr Met Phe Leu Ser Val Asn Leu Phe Asp Arg Phe Leu  
 385 390 395 400

Ser Lys Gly Tyr Phe Lys Thr Lys Arg Cys Leu Gln Ile Val Gly Ile  
 405 410 415

Ala Cys Leu Thr Leu Ala Val Arg Ile Glu Glu Asn Gln Pro Phe Asn  
 420 425 430

Ser Ile Arg Gln Lys Thr Phe Thr Val Ala Gly Thr Ala Tyr Ser Cys  
 435 440 445

Ser Glu Val Val Ala Met Glu Trp Leu Val Gln Glu Val Leu Asn Phe  
 450 455 460

Gln Cys Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Asn Phe Leu Trp Phe Tyr Leu Lys  
 465 470 475 480

Ala Ala Arg Ala Thr Glu Tyr Met Glu Arg Thr Thr Lys Tyr Leu Ala  
 485 490 495

Val Leu Ala Leu Leu Gly His Glu His Leu Cys Tyr Arg Pro Ser Thr  
 500 505 510

Val Ala Ser Ala Leu Val Ile Leu Ala Leu Ser Ala Ala Asn Leu Tyr  
 515 520 525

Val Ser Cys His Leu Val Thr Lys Thr His Ala Lys Ile Lys Asp Glu  
 530 535 540

Asp Leu Pro Glu Cys Ile Lys Ser Leu Glu Trp Leu Val Lys Tyr Ile  
 545 550 555 560

<210> 21  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> nhân tạo

<220>  
 <223> Đoạn mỗi xuôi

<400> 21  
 cgaagagaaa ggattagacg ttg

23

<210> 22  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> nhân tạo

<220>  
 <223> Đoạn mỗi ngược

<400> 22  
 tctgagcagt cagtatcaga cg

22

1/3

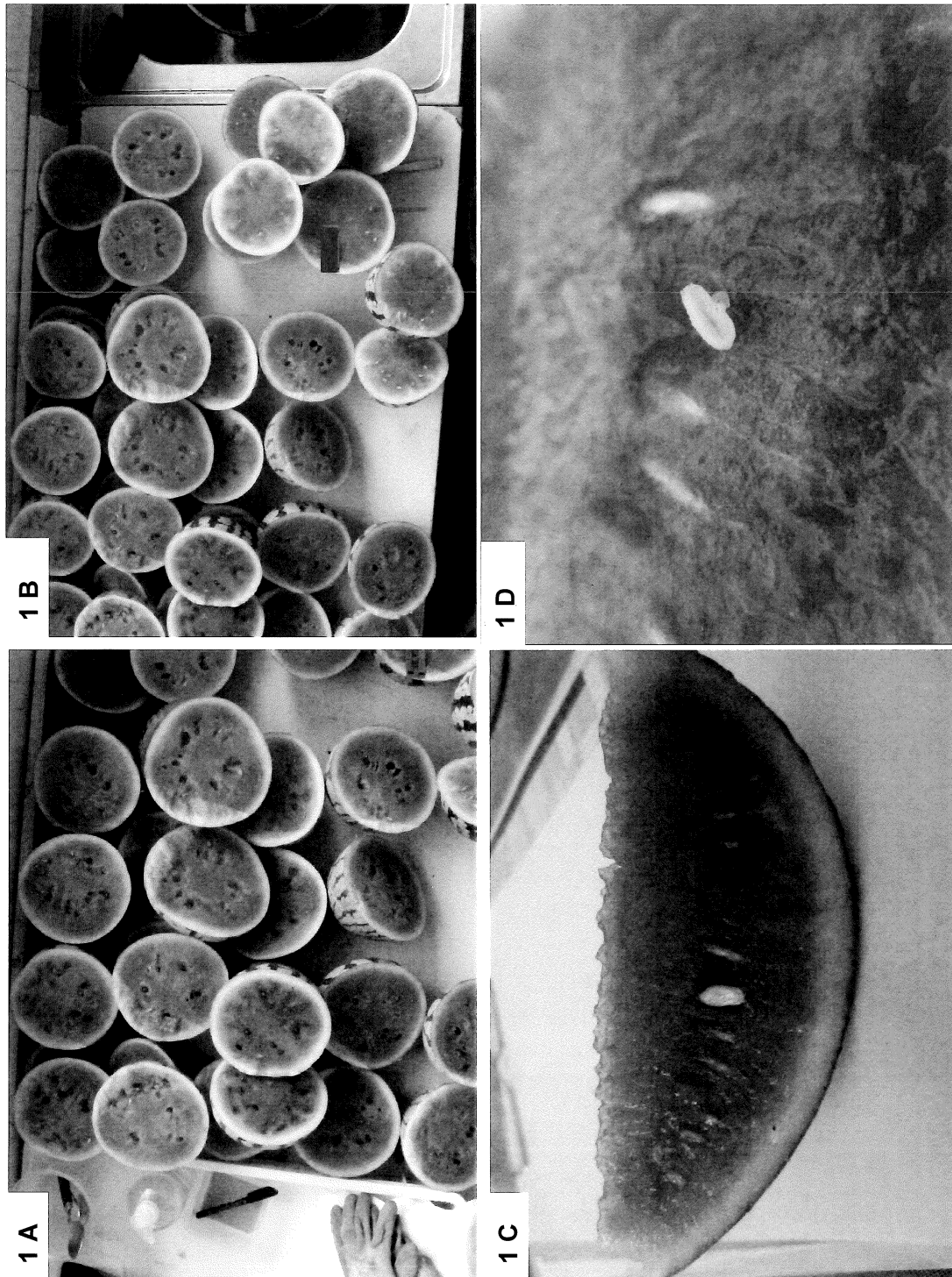


Fig. 1

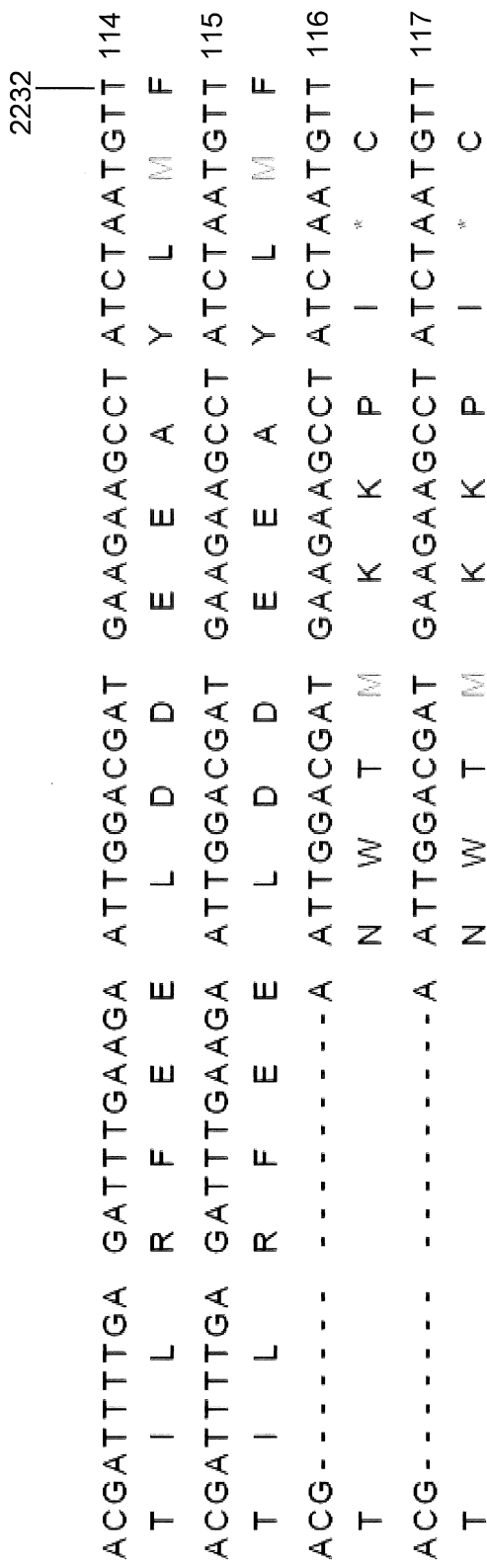
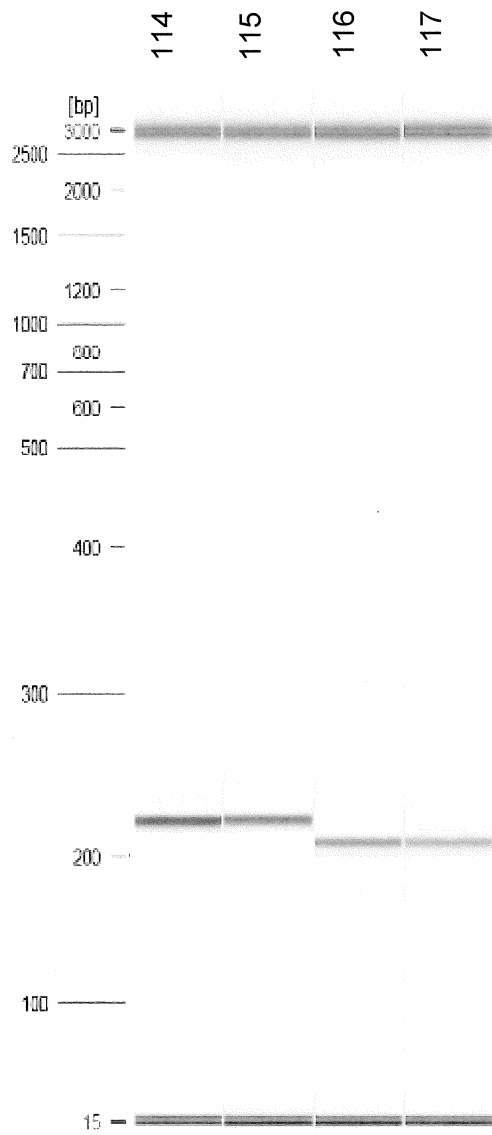


Fig. 2

**Fig. 3**