

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391034 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.24

(22) Дата подачи заявки
2021.10.04

(51) Int. Cl. *A01H 6/34* (2018.01)
A01H 5/08 (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

(54) ПАРТЕНОКАРПИЧЕСКИЕ РАСТЕНИЯ АРБУЗА

(31) 20201337.1; 63/111,898; 63/117,223

(32) 2020.10.12; 2020.11.10; 2020.11.23

(33) EP; US; US

(86) PCT/EP2021/077239

(87) WO 2022/078792 2022.04.21

(71) Заявитель:
НУНХЕМС Б.В. (NL)

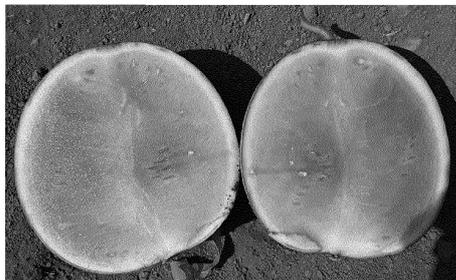
(72) Изобретатель:

Пуглизи Даниэль, Сирицотти
Альберто (IT), Ху Кортни, Мазахери
Мона (US)

(74) Представитель:

Беляева Е.Н. (BY)

(57) Настоящее изобретение относится к растениям арбуза, огурца или дыни, дающим бессемянные плоды. Настоящее изобретение также относится к способам получения указанных растений и способам получения бессемянных плодов арбуза, огурца или дыни.



202391034 A1

202391034 A1

Партенокарпические растения арбуза

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение направлено на партенокарпические растения арбуза, дающие бессемянные плоды без опыления женских цветков благодаря наличию мутантного аллеля рецессивного гена, который обозначается как WAP5.1. Когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, неопыленные цветки дают бессемянные плоды. Однако при опылении цветков образуются нормальные плоды с семенами. Это свойство называется факультативной партенокарпией. Настоящее изобретение также включает способы получения указанных растений и применение мутантного аллеля, обозначаемого как *wap5.1*, для получения бессемянных плодов арбуза.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Большинство бессемянных плодов промышленного значения было получено из растений, плоды которых, как правило, содержат несколько твердых семян относительно большого размера, которые распределены в мякоти плода. Известные растения с бессемянными плодами, например, включают арбуз, томат, огурец, баклажан, виноград, банан, цитрусовые растения, такие как апельсин, лимон и лайм. Из-за того, что потребление бессемянных плодов, как правило, проще и удобнее, они считаются более ценными.

Развитие плода обычно начинается, когда одна или более яйцеклеток в яйцевом аппарате цветка оплодотворяются ядрами спермия из пыльцы.

Бессемянные плоды могут быть получены в результате двух различных явлений. При необходимости, плод развивается без оплодотворения семязачатка пыльцой; такое явление известно как «партенокарпия». В других случаях бессемянные плоды появляются после опыления, когда подавляется рост семян (зародыша и/или эндосперма), или семя рано умирает, в то время как остальная часть плода продолжает расти (стеноспермокарпия). В отличие от партенокарпии в стеноспермокарпии для начала развития плода требуется опыление.

Бессемянные плоды апельсина являются примером партенокарпии. Некоторые сорта апельсина (например, Навел (пупочный

апельсин)) не производят жизнеспособной пыльцы. Однако они могут быть перекрестно опылены пыльцой других сортов. В случае, если в саду выращивается только мужской стерильный сорт, опыление не произойдет, и будут получены партенокарпические бессемянные плоды. Размножение соответствующих апельсиновых деревьев обычно осуществляется черенками с последующей прививкой к другому корневищу.

Бессемянные бананы являются триплоидами. Несмотря на то, что опыление, при необходимости, может происходить обычным способом, большинство плодов не имеет семян. Это объясняется наличием нечетного числа наборов хромосом (3х), что приводит к неправильному расхождению хромосом во время мейоза и, как следствие, к образованию нежизнеспособной пыльцы. У триплоидных бананов также могут развиваться бессемянные плоды без оплодотворения. Даже когда происходит опыление, из трехсот плодов не более чем один плод может содержать несколько семян. Это может быть связано с тем, что триплоидная пыльца нежизнеспособна в силу причин, приведенных выше. Таким образом, банановые растения, в целом, можно рассматривать как партенокарпические. Банановые растения обычно размножаются бесполом путем от боковых побегов или пасынков у основания главного стебля, которые можно удалить и пересадить для получения потомства сорта. Сельхозпроизводители также размножают бананы с помощью тканевой культуры, в частности, таким образом можно получить материал, не зараженный какими-либо болезнями.

Бессемянные огурцы, тыквы и баклажаны являются примерами культур, которые могут давать бессемянные плоды без опыления (партенокарпия), например, в условиях, когда опыление затруднено (например, в условиях низких температур). Тем не менее, даже в этих условиях можно производить фрукты коммерческого качества. Однако после опыления все эти культуры могут давать плоды с семенами. Поэтому эти культуры являются факультативно партенокарпическими. Размножение сельскохозяйственных культур может осуществляться путем самоопыления или перекрестного опыления, размножения *in vitro* и прививки.

В отношении томатных мутантов также известно, что они могут давать бессемянные плоды в условиях, когда нормальное опыление/оплодотворение затруднено (например, в условиях низких температур). Таким образом, эти

культуры также являются факультативно партенокарпическими. Известно, что этот фенотип проявляется у мутантов системы *pat*, *pat-2* и *pat-3/pat-4*. Гены, лежащие в основе этих мутаций, неизвестны, и система *pat-3/pat-4*, по-видимому, зависит от нескольких локусов.

Партенокарпия также была введена в несколько видов растений с помощью генетической модификации. Экспрессия бактериальной триптофанмонооксигеназы (*iaaM*), обеспечивающей синтез ауксина под контролем промотора *DefH9*, специфичного для семязачатка и плаценты, вызывала партенокарпию огурцов (Yin et al., 2006, Clular & molecular Biotech. Letters 11, 279-290), баклажанов (Acciarri et al., 2002, BMC Biotech. 2(4)), помидоров (Rotino et al., 2005, BMC Biotech. 5(32)) и табака.

Эти трансгенные растения демонстрируют важность растительных гормонов для развития семян и плодов. Специалистам хорошо известно, что развитие семян и плодов, помимо других факторов, в значительной степени контролируется несколькими растительными гормонами. Партенокарпия, включая логические последствия бессемянности плодов, также может быть вызвана, например, путем экзогенного применения растительных гормонов, в частности, ауксина или гиббереллина (Ruan et al., Trends in Plant Sci. 17(11), 1360-1385).

Бессемянные арбузы, производимые в настоящее время селекционерами, являются примерами стеноспермокарповых культур. Обычные арбузные растения диплоидны (2n). Арбузы, дающие бессемянные плоды — это гибриды, полученные скрещиванием диплоидного (2n) мужского арбуза с тетраплоидным (4n) женским арбузом. Полученные гибридные семена F1 являются триплоидными (3n). Чтобы вызвать завязывание плодов триплоидных гибридных растений F1 необходимо опыление. Из-за того, что триплоидные (3n) гибриды F1 не производят фертильную пыльцу, на одном поле с ними должны выращиваться так называемые растения-опылители. Эти растения-опылители диплоидны (2n). Как правило, для получения достаточного количества пыльцы для опыления всех гибридов F1 в этой схеме должно быть обеспечено отношение опылителей к гибридам, равное примерно 1:3. Перекрестное опыление между диплоидным (2n) опылителем и цветками женского триплоидного (3n) гибридного растения приводит к завязыванию плодов, после чего на триплоидном гибридном растении происходит образование бессемянных триплоидных плодов. Диплоидные (2n) и тетраплоидные (4n)

родители гибридов F1 дает плоды с семенами, и такие растения могут размножаться независимо друг от друга путем самоопыления.

Бессемянный виноград может быть получен как из партенокарпических, так и стenosпермокарпических сортов. Сорт Black Corinth является партенокарпическим, тогда как Sultanina является стenosпермокарпическим. Виноградные растения, как правило, размножаются с помощью черенков и последующей их прививкой к другому корневищу.

Одним из факторов, приводящих к получению растений с бессемянными плодами, могут быть нарушения в мейозе. Пример растений, дающих бессемянные плоды, приведен в работе Zhang *et al.* (2012, *Scientia Horticulture* 140, 107-114), в которой описаны бессемянные арбузы. Мутант с мужской и женской стерильностью (MFS) был получен из потомка F1-гибрида после воздействия на его семена гамма-излучением. Пыльца от мутанта MFS была полностью нежизнеспособной. Растения MFS дают бессемянные плоды при опылении пылью растений с мужской фертильностью. Поэтому арбуз MFS можно классифицировать как стenosпермокарпический. Семязачатки также были практически полностью нежизнеспособными, так как при перекрестном опылении мутантов MFS пылью с разных растений с мужской фертильностью семена практически не возникали. У мутанта MFS наблюдались неполный синапс и аномальное разделение хроматид во время мейоза, это считается причиной мужской и женской стерильности. Гены, ответственные за эффекты, присутствующие в мутанте MFS, не были идентифицированы, однако представляется вероятным, что фенотип в мутанте MFS обусловлен одним рецессивным геном.

Из приведенного выше пояснения очевидно, что в природе существует много факторов, определяющих то, дают ли растения бессемянные плоды, и что такие факторы могут быть обусловлены несколькими причинами, например, морфологическими, физиологическими и/или генетическими.

Для получения бессемянных плодов у стenosпермокарпических культур, таких как триплоидные (3n) растения арбуза, необходимо опылить женскую часть цветка растения. Стenosпермокарпические культуры, выращиваемые в настоящее время, являются растениями с мужской стерильностью. Как следствие, помимо

женского растения, в том же поле должно выращиваться другое растение с мужской фертильностью (опылитель). Из-за того, что площадь, на которой выращиваются растения-опылители, обеспечивается за счет площади, на которой выращиваются женские растения, дающие бессемянные плоды, урожайность на единицу обрабатываемой площади снижается. Как правило, растения-опылители являются обычными растениями, которые также могут самоопыляться. Однако плоды растений-опылителей дают семена. У арбуза растения-опылители обычно являются диплоидными ($2n$), которые при самоопылении дают плоды с семенами; такие плоды, при необходимости, также можно собирать и продавать отдельно (см. WO2012069539). По коммерческим причинам эти плоды с семенами растений-опылителей нельзя смешивать с бессемянными плодами. Следовательно, до или после сбора урожая необходимо отделять бессемянные плоды от плодов с семенами; это приводит к тому, что машинная уборка урожая является невозможной или требует значительных усилий или дополнительной стадии обработки после сбора урожая.

Эти дополнительные меры увеличивают производственные затраты при получении бессемянных плодов. Кроме того, растения-опылители должны цвести и производить достаточное количество жизнеспособной пыльцы в одно время с тем, когда цветки женского растения и его дыхальце способны принимать пыльцу для начала завязывания плода. Таким образом, время цветения и время оплодотворения для растения-опылителя должно соответствовать времени цветения и времени оплодотворения женского растения, дающего бессемянные плоды. Если время цветения растения-опылителя и соответствующего женского растения недостаточно синхронизировано, опыление происходить не будет или будет происходить лишь в недостаточном количестве случаев. Вследствие этого стеноспермокарпным женским растением производится меньшее количество плодов. Кроме того, специалистом известно, что климатические условия, такие как дождь, жара и т.д., могут влиять на выработку пыльцы растения-опылителя иначе, чем время плодородия дыхальца женского растения, отличающегося генотипом. Следовательно, климатические условия также могут привести к несовпадению времени фертильности опылителей и женских растений, что приводит к снижению урожайности.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что мутация одного рецессивного гена в культурном арбузе, который в настоящем документе называется геном WAP5.1, приводит к тому, что в растения арбуза развивают бессемянные плоды, если цветки не опыляются, т.е. имеет место партенокарпия. Если цветки опылены, развивающиеся плоды производят нормальные жизнеспособные семена. Поэтому партенокарпию этого типа называют факультативной, поскольку она наблюдается только при отсутствии опыления. Следовательно, ген WAP5.1 отвечает за факультативную партенокарпию у арбуза. Таким образом, когда мутантный аллель *wap5.1* присутствует в гомозиготной форме в диплоидном растении арбуза, что в настоящем документе обозначается как *wap5.1/wap5.1*, растения являются факультативными партенокарпами и производят бессемянные плоды из неопыленных цветков и нормальные плоды с семенами из опыленных цветков.

Этот ген имеет большие преимущества у диплоидных арбузов, в частности, в сочетании с мужской стерильностью (МС) для обеспечения отсутствия необходимости опыления женских цветков (поскольку образующиеся на растении мужские цветки являются бесплодными) или в сочетании с мутантом *emb1* (например, в гомозиготной форме *emb1/emb1*), чтобы гарантировать, что в случае опыления плоды будут бессемянными из-за гомозиготного присутствия в растении мутанта *emb1*. Мутант *emb1* представляет собой мутант стеноспермокарпии, в результате чего при опылении образуются бессемянные плоды. Семена, содержащие мутантный аллель *emb1*, были депонированы Nunhems BV 27 января 2016 г. под номером доступа NCIMB42532.

Также ген WAP5.1 обеспечивает большие преимущества в триплоидных арбузах, имеющих, например, две или три копии мутантного аллеля, поскольку больше нет необходимости пересаживать такие триплоидные растения арбуза с растением-опылителем (которое обычно требуется для начала завязывания плодов у нормальных триплоидов, имеющих три копии аллеля WAP5.1 дикого типа). Эти партенокарповые триплоидные растения дают бессемянные плоды без необходимости опыления, которое обычно необходимо для завязывания плодов. Поэтому в основном стеноспермокарповая природа нормальных триплоидных арбузов заменяется на партенокарпию. За счет этого значительно увеличивается урожайность бессемянных триплоидных плодов, поскольку

растения-опылители в поле больше не требуются, и все поле может быть занято триплоидными растениями арбуза.

В популяции мутагенизированных диплоидных растений арбуза M2, выращенных в защищенных от насекомых теплицах, что предотвращает возможность опыления, при скрининге более 20 000 растений наблюдалось растение, дающее плоды без косточек из неопыленных женских цветков (см. Фигуру 1). Плоды содержали только некоторые следы покровов материнского происхождения, подобных тем, что наблюдаются в известных триплоидных бессемянных плодах. Генетический анализ показал, что это свойство сегрегировалось в виде одного рецессивного гена. Ген был обозначен как WAP5.1, а мутантный аллель – *wap5.1*.

Было создано несколько картирующих популяций F2 с разным генетическим фоном из одной линии растений, способных давать партенокарпические плоды. Были фенотипированы и генотипированы две популяции F2, полученные из двух разных фонов. ЛКП был картирован в области размером 0,47 млн п.о. на хромосоме 5, содержащей две мутации, одна из которых в межгенной области, а другая в гене, заменяющем высококонсервативную аминокислоту с лейцина на фенилаланин (L528F). На Фигуре 2 показаны аминокислотные последовательности белков дикого типа и мутантных белков WAP5.1 SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 4, соответственно. Сплошная линия показывает высококонсервативный домен F-box, а пунктирная высококонсервативный домен LRR (домен с богатыми лейцином повторами). На Фигуре 3А показана трехмерная структура белка WAP5.1 дикого типа, демонстрирующая высокоупорядоченную структуру домена LRR на С-конце белка. F-box находится на N-конце белка, а оставшаяся часть белка, следующая за F-боксом (т.е. домен LRR), свернута в своего рода хвостовую структуру с помощью спиралей, бета-мостиков и клубков. Положение аминокислоты лейцина L528, которая, как было обнаружено, заменена фенилаланином (т.е. мутация L528F) в мутантном белке *wap5.1*, показано на Фигуре 3А и является частью кольцевой области домена LRR. На Фигуре 3В показана трехмерная структура мутанта L528F, в которой домен LRR должным образом не сворачивается в хвостовую структуру, а целый участок аминокислот (включая, например, Q581), по-видимому, торчит в виде петель. Считается, что мутантный белок, который не свернут с правильной

укладкой (неправильная трехмерная структура), либо вообще не функционирует *in vivo*, либо имеет нарушенную функцию *in vivo*, по сравнению с белком дикого типа, что приводит к образованию фенотипа (факультативного) партенокарпия, если мутант находится в гомозиготной форме.

В геноме арбуза ген дикого типа находится на хромосоме 5, например, в геноме сорта Чарльстон Грей V2, который приводится на сайте *cucurbitgenomics.org*, ген WAP5.1 помечен как ClCG05G015740.1 и находится на плюс-нити, начиная с нуклеотида 27630305 и заканчивая на нуклеотиде 27637763. Утверждается, что он кодирует белок «F-box/LRR повтор», но его функция *in vivo* и фенотип неизвестны. В линии арбуза, в которой был получен мутант (называемой TY-линия), имеется единственная аминокислота, которая отличается от белка WAP5.1 дикого типа генома Чарльстон Грей V2. Этой единственной аминокислотой является аминокислота номер 51, которая представляет собой глицин (G) в белке WAP5.1, кодируемом геном генома Чарльстон Грей, и аргинин (R) в белке, кодируемом линией TY. Таким образом, белок WAP5.1 дикого типа имеет либо последовательность, например, SEQ ID NO: 1 (G51), либо SEQ ID NO: 9 (R51). Таким образом, при упоминании в настоящем документе белка WAP5.1 дикого типа арбуза (или гена, кодирующего белок WAP5.1 дикого типа) в одном аспекте упоминается белок SEQ ID NO: 1 или белок SEQ ID NO: 9, или белок дикого типа, обнаруживается, содержащий, по мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 9. R51 также обнаружен в других арбузах, таких как сорт 97103 (V2, *cucurbitgenomics.org*). В этом геноме ген называется ClA97C05G096710 и расположен на хромосоме 5 в положении нуклеотидов с 25813434 по 25820323 (плюс-нить). Кодированный этим геном белок WAP5.1 дикого типа на 100% идентичен белку дикого типа линии TY, SEQ ID NO: 9.

Ортологичные белки были получены из общедоступных баз данных для огурца и дыни, как показано на Фигуре 4 (в настоящем документе SEQ ID NO: 2 представляет собой ортолог WAP5.1 огурца, а SEQ ID NO: 3 представляет собой ортолог WAP5.1 дыни). На Фигуре 4 видно, что домен F-box и домен LRR являются высококонсервативными между этими тремя белками, а N-концевая аминокислотная последовательность, предшествующая F-боксу, является более вариабельной, т.е. менее консервативной. Домен F-box на 100% идентичен между

белками WAP5.1 арбуза, дыни и огурца (см. фигуру 4), а домен LRR на 96,2% идентичен между арбузом и огурцом, на 98% между арбузом и дыней и на 97,8% между огурцом и дыней (при попарном выравнивании с использованием программы Needle из пакета Emboss). Это согласуется с исследованиями известных белков доменов F-бок/LRR, см., например, обзор белков F-бок в растениях (Xu et al. 2009, PNAS том 106, № 3, стр. 835–840) и исследование белка F-бок/LRR *Arabidopsis* SLOMO (Lohmann et al., 2010, The Plant Cell, том 22: 335–348). Интересно, что Ломан *и др.* сравнили три разных мутанта SLOMO, *slomo-1*, *slomo-2* и *slomo-3*, где *slomo-1* имел единственную аминокислотную замену в домене LRR, *slomo-2* имел преждевременный стоп-кодон, предшествующий домену LRR, а *slomo-3* имел вставку Т-ДНК в первом интроне, которая предотвращала производство белка (см., например, Фигуру 2А в приложении). Хотя все три мутанта описаны как утратившие функцию, также упоминается, что единственная аминокислотная замена в домене LRR имеет самый сильный фенотип. Таким образом, замена одной аминокислоты может привести к появлению мутантного белка, в результате чего происходит потеря функции или такое ее уменьшение, что фенотип сильно выражен, вероятно, из-за трехмерной структуры (например, правильного сворачивание в качестве и/или взаимодействия с другими белками или субстратами) затронутого домена LRR.

Другие растения арбуза, содержащие мутации в белке WAP5.1, были получены и идентифицированы в популяции TILLING, и в дальнейшем будет установлено, придает ли каждое из них факультативную партенокарпию арбузу, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме. Поскольку неправильное сворачивание мутантного белка L528F, по всей видимости, отвечает за фенотип, разумно предположить, что любая мутация, приводящая к неправильному сворачиванию белка или к его неправильному взаимодействию с субстратами или другими белками, приведет к снижению функции белка или к ее потере и тем самым к факультативной партенокарпии, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме. Очевидно, что мутации, которые приводят к укорочению, например, всего или части домена LRR, также будут приводить и к снижению функции белка или к ее потере, а соответственно и к факультативной партенокарпии, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме. Аналогичным образом ожидается, что наличие мутантного аллеля *wap5.1*,

содержащего одну или более мутаций на регуляторном участке белка, таком как промотор или энхансер, приведет к уменьшению или отсутствию образования активного белка дикого типа, что, следовательно, аналогичным образом приведет к *факультативной* партенокарпии, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

Всего на данный момент в арбузе идентифицировано 9 мутантных аллелей, как показано в Таблице 1. Вопрос о том, будет ли полученный мутантный белок иметь измененную трехмерную структуру, по сравнению с белком WAP5.1 дикого типа, оценивался с использованием RaptorX Contact Prediction (в настоящем документе также используется название RaptorX Structure Prediction).

Таблица 1

ОНП (однонуклеотидный полиморфизм между кодирующей последовательностью дикого типа и мутантной кодирующей последовательностью)	Влияние на белок WAP5.1 (аминокислотная замена или преждевременный стоп-кодон)	Позиция в белке	Воздействие на трехмерную структуру согласно прогнозу RaptorX Structure Prediction*
С/Т	L528F	В домене LRR	Yes (см. Фигуру 3В)
С/Т	A266V	В домене F-box	Неясно, и А, и V являются частью спиральной структуры. Также и А, и V являются гидрофобными, и оба имеют нейтральную боковую цепь. Необходим анализ <i>in vivo</i> .

G/A	E287K	Между доменом F-box и доменом LRR	
C/T	A257V	В домене F-box	Неясно, и A, и V являются частью спиральной структуры. Также и A, и V являются гидрофобными, и оба имеют нейтральную боковую цепь. Необходим анализ <i>in vivo</i> .
C/T	Q333Stop	В домене LRR	Да (усечение)
G/A	W274Stop	В домене F-box	Да (усечение)
A/G	D209V	В N-конце, предшествующем домену F-box	Неясно, и D, и V являются частью спиральной структуры, но V гидрофобна, а D гидрофильна; необходим анализ <i>in vivo</i>
C/T	P308L	В домене LRR	Будет уточняться
G/A	G330E	В домене LRR	Будет уточняться

*адрес в сети Интернет //raptorx.uchicago.edu/ContactMap/

Как уже упоминалось ранее, ожидается, что, по меньшей мере, те мутантные белки, которые имеют аминокислотную замену в высококонсервативном домене F-box или в домене LRR, по сравнению с белком дикого типа, или которые имеют стоп-кодон или преждевременный стоп-кодон, что приводит к отсутствию всего или части домена F-box или LRR, и/или которые согласно прогнозам демонстрируют модифицированную трехмерную структуру/неправильное трехмерное сворачивание, по сравнению с белком WAP5.1 дикого типа, будут демонстрировать фенотип, когда мутантный аллель находится в гомозиготной

форме (т.е. растения будут демонстрировать факультативную партенокарпию), т.е. будут давать бессемянные плоды без опыления и плоды с семенами при опылении, когда мутантные аллели находятся в гомозиготной форме, например, в диплоидном растении. Действительно ли это так, можно проверить посредством создания растений, являющихся гомозиготными по мутантному аллелю *wap5.1*, выращивания их в отсутствие опыления и проведения анализа относительно того, дают ли они бессемянные плоды в этих условиях, и дают ли они плоды с семенами при опылении. Очевидно, что другие мутантные аллели *wap5.1* могут быть получены, например, путем случайного или целенаправленного мутагенеза в гене WAP5.1 арбуза, огурца или дыни.

Вышеупомянутые или другие мутанты в эндогенном гене WAP5.1 растения можно получить, например, с помощью случайного или направленного мутагенеза, таких как способы на основе CRISPR. Обзор целенаправленного редактирования генов приводится, например, Erpen-Dalla Corte et al. в Plants 2019, 8, 601 (doi:10.3390/plants8120601) и Bed Prakash Bhatta and Subas Malla в Plants 2020, 9, 1360; doi:10.3390/plants9101360. Редактирование на основе Crispr также уже проводилось в арбузе и других тыквенных культурах, и поэтому специалист может использовать его для редактирования эндогенного гена WAP5.1 арбуза, дыни, огурца или других видов тыквенных, содержащих ортологичный ген.

Что касается мутаций в консервативном домене F-бок и/или в домене LRR (или в других частях белка), в одном аспекте в частности, мутации, которые приводят к заменам аминокислот, благодаря чему свойства аминокислоты дикого типа и замененной аминокислоты отличаются, являются одним из аспектов настоящего документа, поскольку такие различные свойства аминокислот будут снижать или не допускать правильное сворачивание и/или нормальную функцию белка или домена. Например, это замена неполярной аминокислоты полярной (содержащей гидрофильную боковую цепь) или *наоборот*, или замена аминокислоты, имеющей заряженную боковую цепь, незаряженной или иначе заряженной боковой цепью. неполярными аминокислотами являются аланин (A или Ala), цистеин (C или Cys), глицин (G или Gly), изолейцин (I или Ile), лейцин (L или Leu), метионин (M или Met), фенилаланин (F или Phe), пролин (P или Pro), триптофан (W или Trp), валин (V или Val). Полярными аминокислотами являются аргинин (R или Arg), аспарагин (N или Asn), аспартат (D или Asp), глутамат (E или

Glu), глутамин (Q или Gln), гистидин (H или His), лизин (K или His). Lys), серин (S или Ser), треонин (T или Thr), тирозин (Y или Tyr).

Таким образом, в одном аспекте любая одна (или более) из 24 неполярных аминокислот домена F-box замещается полярной аминокислотой, и/или любая одна (или более) из 17 полярных аминокислот домена F-box замещается неполярной аминокислотой. Полученный мутантный аллель далее можно проверить на наличие его функции путем создания растения, гомозиготного по мутантному аллелю, и анализа его фенотипа. Если наличие мутантного аллеля приводит к тому, что растение становится факультативно партенокарпическим, то мутантный аллель представляет собой аллель, кодирующую мутантный белок *wap5.1*, имеющий ограниченную функцию или не демонстрирующий наличие функции *in vivo*.

WAP5.1 арбуза представляет собой ген, кодирующий белок WAP5.1, причем белок WAP5.1 представляет собой белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или белок, имеющий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9. Ген *WAP5.1* арбуза также может обозначаться как *CIWAP5.1*, для *Citrullus lanatus WAP5.1*. Белок дикого типа SEQ ID NO: 1 представляет собой белок, который присутствует, например, в геноме сорта Чарльстон Грей, но в других культурных арбузах, таких как используемая в настоящем документе линия TY или восточно-азиатский сорт 97103, геном которого также был упорядочен и представлен на suscubitgenomics.org как V1 и V2, имеются небольшие различия в 1 или 2 аминокислотах, т.е. белок на 99,9% или 99,8% идентичен этому SEQ ID NO: 1. Следовательно, другие культурные арбузы содержат ген WAP5.1, который кодирует белок WAP5.1 дикого типа (функциональный), имеющий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или 99,5% или 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. В качестве примера можно привести ген, кодирующий белок SEQ ID NO: 9, который отличается от белка SEQ ID NO: 1 только одной аминокислотой: аминокислотой 51. SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 9, таким образом, на 99,9% идентичны по аминокислотной последовательности, и оба являются функциональными белками WAP5.1 (дикого типа). Растения арбуза, содержащие гены, которые кодируют эти белки дикого типа, не являются партенокарпическими, т.е. они дают плоды только после опыления.

В другом аспекте ген огурца WAP5.1 представляет собой ген, кодирующий белок WAP5.1, причем белок WAP5.1 представляет собой белок SEQ ID NO: 2 или белок, имеющий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Ген огурца WAP5.1 также может обозначаться как CsWAP5.1 для *Cucumis sativus* WAP5.1.

В другом аспекте ген дыни WAP5.1 представляет собой ген, кодирующий белок WAP5.1, причем белок WAP5.1 представляет собой белок SEQ ID NO: 3 или белок, имеющий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Ген WAP5.1 дыни также может обозначаться как CmWAP5.1 для *Cucumis melo*.

В одном аспекте изобретения предложено растение или растительная клетка, причем это растение или растительная клетка имеют пониженную активность белка WAP5.1, по сравнению с соответствующей растительной клеткой дикого типа, при этом белок WAP5.1 растительной клетки дикого типа кодируется молекулами нуклеиновых кислот, выбранными из группы, состоящей из:

- a) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих белок с аминокислотной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (арбуз), или SEQ ID NO: 2 (огурец), или SEQ ID NO: 3 (дыня);
- b) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих белок, последовательность которого, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентична аминокислотной последовательности под номером SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (арбуз), или SE ID NO: 2 (огурец), или SEQ ID NO: 3 (дыня);
- c) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих белок, последовательность которого, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентична аминокислотной последовательности под номером SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (арбуз), или SED ID NO: 2 (огурец), или SEQ ID NO: 3 (дыня), и при этом белок содержит аминокислотную последовательность домена F-box, т.е. аминокислоты 237 – 277 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (аминокислоты LTDDLHLMVFSFLDHINLCRAAIVCRQWQA ASAHEDFWRCL – SEQ ID NO: 13), и содержит домен LRR, при этом домен LRR представляет собой область от аминокислоты 291 -

1033 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (арбуз), или от аминокислоты 298 – 1040 SEQ ID NO: 2 (огурец), или от аминокислоты 301 – 1043 (дыня).

Снижение активности белка WAP5.1 вызвано мутантным аллелем *wap5.1*. Снижение активности может быть вызвано нокдауном или нокаутом экспрессии мутантного аллеля *wap5.1* (например, посредством мутации в промоторе или другой регуляторной последовательности) или мутантным аллелем *wap5.1*, кодирующим белок WAP5.1 с потерей функции или с пониженной функцией (мутантный белок WAP5.1).

В одном аспекте мутантный аллель *wap5.1* кодирует мутантный белок WAP5.1 с потерей функции или с пониженной функцией, по сравнению с белком дикого типа, например, мутантный белок WAP5.1 содержит замещенную, удаленную или вставленную одну или более аминокислот, по сравнению с белком дикого типа. В одном аспекте мутантный белок WAP5.1 содержит одну или более аминокислот, замещенных, удаленных или вставленных в консервативный домен «F-box» белка и/или в консервативный домен LRR белка. В предпочтительном аспекте, по меньшей мере, одна аминокислота в консервативном «домене F-box» и/или в «домене LRR» замещена другой аминокислотой или стоп-кодоном, что приводит к потере или снижению функции белка и к факультативной партенокарпии, когда аллель находится в гомозиготной форме (когда в диплоидном растении или растительной клетке нет аллеля дикого типа). В другом аспекте одна или более аминокислот консервативного «домена F-box» и/или «домена LRR» отсутствуют, например, из-за мутации, вызывающей появление преждевременного стоп-кодона, что приводит к потере или снижению функции белка и к факультативной партенокарпии, когда аллель находится в гомозиготной форме (когда аллель дикого типа отсутствует в диплоидном растении или растительной клетке).

В одном аспекте мутантный аллель *wap5.1* кодирует мутантный белок WAP5.1, имеющий трехмерную структуру (сворачивание белка), которая модифицирована, по сравнению с трехмерной структурой (сворачиванием белка) белка WAP5.1 дикого типа, что можно увидеть путем сравнения трехмерных структур белка дикого типа и мутантного белка с использованием, например, инструмента RaptorX Contact Prediction. В частности, можно легко увидеть

аминокислотные изменения (замены или делеции), которые влияют на правильное сворачивание домена LRR. Домен LRR дикого типа сворачивается в структуру, подобную длинному хвосту, как показано на Фигуре 3А. Любое неправильное сворачивание становится легко видимым, как показано, например, на Фигуре 3В. Кроме того, отсутствие всего или части домена LRR в укороченном белке WAP5.1 представлено в настоящем документе в качестве белка, имеющего модифицированную трехмерную структуру/сворачивание белка, по сравнению с белком дикого типа. Поскольку домен LRR высоко структурирован и консервативен, предполагается, что любые изменения в его структуре приведут к потере или снижению функции белка и, таким образом, к появлению фенотипа *in vivo* (факультативная партенокарпия), когда мутантный аллель находится в гомозиготном состоянии в диплоидном растении.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует мутантный белок, в котором аминокислота 528, 266, 287, 257, 333, 274, 209, 308 или 330 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или эквивалентная аминокислота в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9, или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3 удалена или замещена другой аминокислотой или стоп-кодоном. Эквивалентная аминокислота может быть идентифицирована путем попарного сопоставления (например, с использованием программы Needle), например, с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, смотрите, например, Фигуру 4, при котором упомянутые аминокислоты арбуза и эквивалентные аминокислоты огурца и дыни показаны жирным шрифтом.

В одном аспекте L528 белка арбуза (или эквивалентная аминокислота в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9, или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3), замещен F, и/или A266 белка арбуза (или эквивалентная аминокислота в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94% или 95% идентичности с SEQ ID NO: 1, или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3) замещен V, и/или E287 белка арбуза (или эквивалентная аминокислота в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9, или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3) замещен K, и/или A257 белка

арбуза (или эквивалентная аминокислота в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9, или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3) замещен V, и/или Q333 белка арбуза (или эквивалентная аминокислота в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9, или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3) замещен стоп-кодоном, и/или W274 белка арбуза (или эквивалентная аминокислота в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9, или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3) замещен стоп-кодоном, и/или D209 белка арбуза (или эквивалентная аминокислота в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9, или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3) замещен V, и/или P308 белка арбуза (или эквивалентная аминокислота в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9, или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3) замещен L, и/или G330 белка арбуза (или эквивалентная аминокислота в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9, или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3) замещен E.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предлагается культурное растение арбуза, огурца или дыни или часть растения, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена WAP5.1, причем указанный мутантный аллель придает факультативную партенокарпию, когда он находится в гомозиготной форме.

В одном аспекте ген расположен на хромосоме 5 генома арбуза, в частности, в области, начинающейся с пары оснований 27630305 и заканчивающейся парой оснований 27637763 хромосомы 5, т.е. хромосомы Чарлстон Грей, или в области, начинающейся с пары оснований 25813434 и заканчивающейся парой оснований 25820323 хромосомы 5, например, хромосомы арбуза 97103 V2.

В одном варианте осуществления растение или часть растения, содержащие мутантный аллель гена WAP5.1, являются диплоидными, тетраплоидными, триплоидными или полиплоидными. Предпочтительно мутантный аллель присутствует в двух копиях в диплоидном растении или части растения, в четырех копиях в тетраплоидном растении или части растения или в одной, двух или трех копиях в триплоидном растении или части растения.

При необходимости, растение или часть растения, которые содержат мутантный аллель гена WAP5.1, дополнительно содержат ген, придающий мужское бесплодие, или ген, придающий стеноспермокарпию, такой как ген, описанный в WO2017202715 и/или в WO2019238832.

При необходимости, растение или часть растения, которое содержит мутантный аллель гена WAP5.1, дополнительно содержит ген, придающий партенокарпию, например, ген, описанный в WO2018/060444.

Частью растения, содержащей мутантный аллель гена WAP5.1, может быть клетка, цветок, лист, стебель, черенок, семязачаток, пыльца, корень, подвой, привой, плод, протопласт, зародыш, пыльник.

Также в изобретении раскрывается вегетативно размножаемое растение арбуза, огурца или дыни, которое размножается из такой части растения, содержащей, по меньшей мере, один мутантный аллель гена WAP5.1.

Аналогичным образом предоставляется семя, из которого могут быть выращены растение по изобретению.

Кроме того, предложен бессемянный плод, произведенный растением согласно изобретению.

Предложен способ получения бессемянных плодов арбуза, огурца или дыни, включающий выращивание диплоидного растения, содержащего две копии мутантного аллеля гена WAP5.1, а также сбора плодов, производимых указанными растениями. В частности, плоды развиваются без опыления женских цветков, тогда как плоды с семенами образуются при опылении цветков.

Предложен способ получения бессемянных плодов арбуза, включающий выращивание триплоидного растения, содержащего одну, две или три копии мутантного аллеля гена WAP5.1, а также сбора плодов, производимых указанными

растениями. В частности, плоды развиваются без опыления женских цветков, т. е. для стимулирования развития плодов пыльца не требуется.

Предложен способ выращивания растений арбуза, включающий выращивание триплоидного растения арбуза, содержащего одну, две или три копии мутантного аллеля гена WAP5.1, в частности, в поле без растений-опылителей, и, при необходимости, сбора бессемянных плодов арбуза с указанных растений.

Предложен способ получения факультативного партенокарпического культурного арбуза, огурца или растения дыни, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений арбуза, огурца или дыни; или предоставление популяции мутантных растений (например, популяции TILLING, например, M2, M3, M4 или последующего поколения);
- b) выбор растения, дающего бессемянные плоды без опыления женских цветков, а также плоды с семенами после опыления женских цветков;
- c) при необходимости, проверку наличия в растении, выбранном в соответствии с пунктом b), мутантного аллеля гена WAP5.1; и
- d) при необходимости, выращивание растений, полученных на этапе c).

Предложен способ получения факультативного партенокарпического культурного арбуза, огурца или растения дыни, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в растение арбуза, огурца или дыни; или предоставление популяции мутантных растений (например, популяции TILLING, например, M2, M3, M4 или последующего поколения);
- b) выбор растения, содержащего мутантный аллель гена WAP5.1;
- c) при необходимости, самоопыление выбранного растения с получением растения, гомозиготного по мутантному аллелю гена WAP5.1;
- d) при необходимости, выращивание растений.

Арбуз, огурец или дыня, растение или плод, полученные данным способом, раскрываются в настоящем документе.

Использование факультативного партенокарпического растения арбуза, огурца или дыни для получения бессемянных плодов арбуза, огурца или дыни, предпочтительно без опыления женских цветков растения, также является аспектом изобретения.

Применение мутантного аллеля *wap5.1* гена WAP5.1 в соответствии с описанием в настоящем документе для получения факультативных партенокарпических растений арбуза, огурца или дыни также является аспектом изобретения.

Предложен способ получения культурного растения арбуза, огурца или дыни, дающего бессемянные плоды в отсутствие опыления и плоды с семенами при наличии опыления, включающий следующие этапы:

- a) введение случайных или целенаправленных мутаций в одно или более растений, части растения или семена арбуза, огурца или дыни; или предоставление популяции мутантных растений или семян (например, популяции TILLING, например, M2, M3, M4 или последующего поколения),
- b) выбор растения, содержащего мутантный аллель гена *wap5.1*, например, мутантный аллель, который производит значительно уменьшенный белок WAP5.1 дикого типа или не производит его (например, нокаутированный аллель) или который кодирует белок, содержащий одну или более аминокислот, удаленных, замененных, вставленных или дублированных, по сравнению с белком дикого типа,
- c) при необходимости, удаление любой трансгенной конструкции (например, конструкции CRISPR) из растения, и/или
- d) при необходимости, получение растения, гомозиготного по мутантному аллелю, и анализ наличия развития бессемянных плодов в отсутствие опыления, а также развитие плодов с семенами при наличии опыления.

Предложен способ отбора или идентификации растений, семян или частей растений арбуза, огурца или дыни, включающий следующие этапы:

- a) анализ содержания в геномной ДНК растения или части растения мутантного аллеля и/или содержания аллеля дикого типа гена WAP5.1 в их геноме и, при необходимости,
- b) выбор растения или части растения, содержащих в геноме одну или две копии мутантного аллеля гена *wap5.1*,

причем аллель дикого типа гена WAP5.1 арбуза кодирует белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9), аллель дикого типа ген WAP5.1 огурца кодирует белок SEQ ID NO: 2 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 2) и аллель дикого типа гена WAP5.1 дыни кодирует белок SEQ ID NO: 3 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 3).

Этап а) может быть осуществлен различными способами, например, с использованием методов, основанных на ПЦР, на секвенировании, на гибридизации нуклеиновых кислот, уровней экспрессии генов и т.д. В одном аспекте, например, может использоваться анализ KASP.

Предложен способ скрининга (например, генотипирования) геномной ДНК растений, семян или частей растений арбуза, огурца или дыни, включающий следующие этапы:

- a) предоставление образца (или множества образцов) геномной ДНК растения арбуза, дыни или огурца или множества растений (например, популяции F₂, инбредных линий, популяции обратного скрещивания, селекционной популяции, гибридных растений и т.д.),
- b) предоставление пары праймеров для ПЦР или олигонуклеотидного зонда, где праймеры или (олигонуклеотидный) зонд содержат, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или более последовательных нуклеотидов геномного аллеля WAP5.1 гена WAP5.1 арбуза, огурца или дыни и может гибридизоваться с геномным аллелем и/или амплифицировать часть геномного аллеля в анализе ПЦР, и
- c) проведение анализа ПЦР с использованием пары праймеров или анализа гибридизации с использованием зонда этапа b) на образце(ах) этапа a) и, при необходимости,
- d) выбор растения или части растения или семени, содержащих одну или две копии аллеля (например, аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля) гена WAP5.1 арбуза, огурца или дыни в геноме,

причем ген Wap5.1 аллеля дикого типа арбуза кодирует белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9), ген WAP5.1

аллеля дикого типа огурца кодирует белок SEQ ID NO: 2 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 2), и ген WAP5.1 аллеля дикого типа дыни кодирует белок SEQ ID NO: 3 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 3).

На этапе b) пара праймеров для ПЦР представляет собой, по меньшей мере, один прямой праймер, комплементарный одной из цепей ДНК аллеля WAP5.1, и один обратный праймер, комплементарный другой цепи ДНК аллеля WAP5.1, причем эта пара праймеров гибридизуется с денатурированной геномной ДНК и амплифицирует часть аллеля WAP5.1 в реакции ПЦР. Праймеры могут разрабатываться для амплификации аллеля дикого типа или любого мутантного аллеля WAP5.1 с использованием инструментов разработки праймеров. В одном аспекте используют два прямых праймера, один из которых предназначен для амплификации аллеля дикого типа, а другой для амплификации мутантного аллеля гена WAP5.1, а также один общий обратный праймер. Эти три праймера можно использовать в KASP-анализе для генотипирования образцов с этапа a). Таким образом, в одном аспекте анализ на этапе c) является KASP-анализом, но также могут использоваться и другие анализы генотипирования, как те, что описаны на странице по адресу biosearchtech.com/sectors/agrigenomics/agrigenomics-pcr-qpcr-technologies.

В одном аспекте анализ различает аллель дикого типа и мутантный аллель гена WAP5.1, например, аллель WAP5.1 дикого типа и мутантный аллель из таблицы 1 или другой мутантный аллель.

Для анализа геномной ДНК может потребоваться, по меньшей мере, ее грубая экстракция. Присутствие мутантного аллеля или аллеля дикого типа в геномной ДНК можно обнаружить прямо или косвенно. Непосредственно это может быть выполнено, например, путем гибридизации нуклеиновых кислот, например, олигонуклеотидных зондов. Косвенно может выполняться, например, путем амплификации нуклеиновой кислоты с использованием, например, праймеров для ПЦР, которые содержат, например, хвостовую последовательность, присоединенную к праймеру, и во время ПЦР аллель-специфический праймер связывается с матричной ДНК и удлиняется, тем самым присоединяя хвостовую последовательность к вновь синтезированной цепи, и в последующих раундах ПЦР

кассета FRET (флуоресцентная резонансная кассета для переноса энергии) связывается с хвостом и излучает флуоресценцию. Затем можно обнаружить флуоресцентный сигнал. Это используется, например, в KASP-анализе.

Мутантный аллель может отличаться от аллеля дикого типа в различных аспектах, например, в последовательности промотора или в последовательности, кодирующей белок, или в сайтах сплайсинга интронов/экзонов. Мутантный аллель может иметь пониженную экспрессию гена или не экспрессировать ген, или может приводить к производству белка, содержащего одну или более делетированных, замененных, вставленных или дублированных аминокислот, по сравнению с белком дикого типа.

В одном аспекте мутантный аллель представляет собой аллель, кодирующий мутантный белок, как описано в Таблице 1.

В одном аспекте растение или часть растения представляет собой арбуз, и мутантный аллель кодирует белок SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10.

Также предусмотрены способы создания и/или селекции растений или частей растений, содержащих, по меньшей мере, один мутантный аллель гена *WAP5.1* арбуза, или гена *WAP5.1* огурца, или гена *WAP5.1* дыни в их геноме.

В одном аспекте также предложен способ обнаружения присутствия аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена *WAP5.1* арбуза или гена *WAP5.1* огурца, или гена *WAP5.1* дыни в геноме.

В одном аспекте способ определения того, содержит ли растение арбуза, его часть или семя, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа, например, кодирующего белок SEQ ID NO: 1 или 9, и/или содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля, например, кодирующего белок SEQ ID NO: 4 или 10, или мутантный белок, как показано в Таблице 1, и, при необходимости, выбирают растение, часть растения или семя, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *wap5.1*.

Также предоставляется KASP-анализ (Kbioscience Kompetitive аллель-специфический ПЦР-генотипический анализ), включающий два аллель-специфических прямых праймера, например, праймер FAM и праймер VIC, и общий обратный праймер. Очевидно, что могут быть разработаны другие аллель-специфические праймеры для обнаружения и/или различения аллеля дикого типа и

любого другого мутантного аллеля, содержащего, например, одну или более аминокислот, замененных, дублированных, делетированных или вставленных по отношению к белку дикого типа.

Аналогичным образом выделяют последовательности или молекулы геномной последовательности (дикого типа или мутанта), последовательности кДНК или мРНК, белковые последовательности, а также олигонуклеотидные праймеры или зонды для обнаружения аллеля дикого типа или мутантного аллеля гена *WAP5.1* арбуза или огурца или гена *WAP5.1* дыни включены в настоящее описание.

Также предложен способ получения продукта ПЦР-амплификации и/или продукта гибридизации олигонуклеотидов (части) геномной ДНК растений, семян или частей растений арбуза, огурца или дыни, включающий следующие этапы:

- a) предоставление образца (или множества образцов) геномной ДНК растения арбуза, дыни или огурца, или множества растений (например, популяции F2, инбредных линий, популяции обратного скрещивания, селекционной популяции, гибридных растений и т.д.),
- b) предоставление, по меньшей мере, пары праймеров для ПЦР или олигонуклеотидного зонда, где праймеры или (олигонуклеотидный) зонд содержат, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или более последовательных нуклеотидов геномного аллеля *WAP5.1* гена *WAP5.1* арбуза, огурца или дыни и может гибридизоваться с геномным аллелем и/или амплифицировать часть геномного аллеля в анализе ПЦР, и
- c) проведение анализа ПЦР с использованием пары праймеров или анализа гибридизации с использованием зонда этапа b) на образце(ах) этапа a) для получения продукта амплификации ПЦР и/или продукта гибридизации олигонуклеотидов, и, при необходимости,
- d) выбор растения или части растения или семени, содержащих одну или две копии аллеля (например, аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля) гена *WAP5.1* в геноме,

причем аллель дикого типа гена *WAP5.1* арбуза кодирует белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO:

9), аллель дикого типа гена WAP5.1 огурца, кодирующий белок SEQ ID NO: 2 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 2) и аллель дикого типа гена WAP5.1 дыни, кодирующий белок SEQ ID NO: 3 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 3).

Кроме того, предложен способ амплификации и/или гибридизации (части) геномной ДНК растений, семян или частей растений арбуза, огурца или дыни, включающий следующие этапы:

- a) предоставление образца (или множества образцов) геномной ДНК растения арбуза, дыни или огурца, или множества растений (например, популяции F2, инбредных линий, популяции обратного скрещивания, селекционной популяции, гибридных растений и т.д.),
- b) предоставление, по меньшей мере, пары праймеров для ПЦР или олигонуклеотидного зонда, где праймеры или (олигонуклеотидный) зонд содержат, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или более последовательных нуклеотидов геномного аллеля WAP5.1 гена WAP5.1 арбуза, огурца или дыни и может гибридизоваться с геномным аллелем и/или амплифицировать часть геномного аллеля в анализе ПЦР, и
- c) проведение анализа ПЦР с использованием пары праймеров или анализа гибридизации с использованием зонда этапа b) на образце(ах) этапа a) для получения продукта амплификации ПЦР и/или продукта гибридизации олигонуклеотидов, и, при необходимости,
- d) выбор растения или части растения, или семени, содержащего одну или две копии аллеля (например, аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля) гена WAP5.1 арбуза, огурца или дыни в геноме,

причем аллель дикого типа гена WAP5.1 арбуза кодирует белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9), аллель дикого типа гена WAP5.1 огурца, кодирующий белок SEQ ID NO: 2 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 2) и аллель дикого типа гена WAP5.1 дыни,

кодирующий белок SEQ ID NO: 3 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 3).

Также предоставляется набор для генотипирования, включающий праймеры и/или зонды и реакционные компоненты для амплификации и/или гибридизации части геномной ДНК гена WAP5.1.

Праймеры и зонды предпочтительно маркируют или модифицируют, например, хвостовой последовательностью или меткой, чтобы иметь возможность обнаруживать продукты реакции амплификации или гибридизации.

ОБЩИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термин «включать» и «содержать» и их формы не имеют ограничительного характера; это подразумевает то, что перечисленные наименования включены в указанную группу, при этом указанная группа также может включать иные наименования, которые не были прямо упомянуты. Кроме того, при упоминании по тексту настоящего документа какого-либо элемента в единственном числе подразумевается также, что может присутствовать несколько таких элементов, за исключением случаев, когда из контекста очевидно следует, что присутствует лишь один такой элемент. Таким образом, например, использование термина в единственном числе означает «по меньшей мере один», например, выражение «клетка растение» относится также к нескольким клеткам растения и т.д. Аналогичным образом, термины «фрукт» или «растение» также относятся к множеству фруктов и растений.

При использовании по тексту настоящего документа термин «растение» включает все растение или любые его части или производные, предпочтительно имеющие тот же генетический состав, что и растение, из которого оно получено, например, органы растения (например, собранные или несобранные плоды, листья, цветки, пыльники и т.д.), клетки растений, протопласты растений, культуры тканей клеток растений, из которых могут быть регенерированы целые растения, каллусы растений, скопления клеток растений, трансплантаты растений, проростки, клетки растений, которые не повреждены в растениях, клоны растений или единицы микроразмножения или части растений, такие как черенки растений, зародыши, пыльца, пыльники, семяпочки, плоды (например, собранные ткани или органы), цветы, листья, семена, клонально размножаемые растения, корни, стебли, кончики

корней, черенки (привои и/или корневища) и тому подобное. Кроме того, включаются любые стадии развития, такие как проростки, черенки до или после укоренения и т.д. Когда упоминаются «семена растения», они относятся либо к семенам, из которых растение может быть выращено, либо к семенам, полученным на растении, после самооплодотворения или перекрестного оплодотворения.

При использовании по тексту настоящего документа термин «сорт» относится к группе растений в одном ботаническом таксоне низшего известного уровня, при этом такая группа может определяться экспрессией характеристик, полученных из определенного генотипа или комбинации генотипов.

Термин «аллель(и)» означает любую из одной или более альтернативных форм гена в конкретном локусе, например, локус WAP5.1 (где расположен ген WAP5.1; аллели гена могут быть аллелями дикого типа, обозначенными как *WAP5.1*, или мутантными аллелями, обозначенными как *wap5.1*), причем все они относятся к одному свойству или характеристике в конкретном локусе (например, факультативная партенокарпия). В диплоидной клетке организма аллели определенного гена находятся в определенном месте или локусе (мн. локусы) в хромосоме. Один аллель присутствует в каждой хромосоме пары гомологичных хромосом. Диплоидные виды растений могут включать в себя большое число различных аллелей в определенном локусе. Это могут быть идентичные аллели гена (гомозиготные) или два разных аллеля (гетерозиготные), например, две идентичные копии мутантного аллеля *wap5.1* (т.е. *wap5.1/wap5.1*) или одна копия мутантного аллеля *wap5.1* и одна копия аллеля дикого типа (т.е. *wap5.1/WAP5.1*). Аналогичным образом триплоидное растение называют гомозиготным по гену, если оно имеет три идентичных аллеля гена (например, три копии мутантного аллеля *wap5.1*, т.е. *wap5.1/wap5.1wap5.1*), а тетраплоидное растение называют гомозиготным по гену, если оно имеет четыре идентичных аллеля гена, например, четыре копии мутантного аллеля *wap5.1* (т.е. *wap5.1 /wap5.1 /wap5.1 /wap5.1*).

«Ген WAP5.1» представляет собой единственный рецессивный ген, идентифицированный в культурном арбузе на хромосоме 5, мутация которого приводит к партенокарпии, в частности, к факультативной партенокарпии. *WAP5.1* представляет собой функциональный аллель дикого типа (АДТ), присутствующий в непартенокарпических культурных растениях арбуза,

а *wap5.1* представляет собой мутантный аллель, приводящий к партенокарпии, если аллель находится в гомозиготной форме в диплоидном (*wap5.1/wap5.1*), триплоидном (*wap5.1/wap5.1/wap5.1*), тетраплоидном (*wap5.1/wap5.1/wap5.1/wap5.1*) или другом полиплоидным, например, октаплоидном растении и т.д. В одном аспекте ген WAP5.1 представляет собой ген, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или белок, имеющий, по меньшей мере, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9 (арбуз), при попарном выравнивании. Это включает в одном аспекте ортологи WAP5.1 в огурце (SEQ ID NO: 2) и дыне (SEQ ID NO: 3).

Термин «партенокарпия» или «партенокарпический» является общеизвестным для специалистов в данной области, и в контексте настоящего изобретения он означает развитие плодов без оплодотворения женского семязачатка. Для получения плодов не требуется процесс опыления, однако, вследствие отсутствия опыления плоды не имеют семян. Таким образом, партенокарпия означает образование плодов на растении без опыления женских цветков. Аналогичным образом «партенокарпическое растение» или «растение, содержащее мутантный ген (или мутантный аллель гена), придающий партенокарпию в гомозиготной форме» означает, что растение дает бессемянные плоды без опыления женских цветков.

Под «факультативной партенокарпией» понимают, что признак партенокарпии не проявляется при опылении цветка факультативного партенокарпического растения, и в этом случае происходит нормальное оплодотворение и нормальное развитие плодов. По мере нормального оплодотворения плоды засеиваются.

«F1», «F2», «F3» и т.д. относится к последовательным связанным поколениям, полученным в результате скрещивания двух родительских растений или родительских линий. Растения, выращенные из семян, полученных путем скрещивания двух растений или линий, называются поколение F1. В результате самоопыления растений F1 получают поколение F2 и т.д.

Растение «гибрид F1» (или семя «гибрид F1») – это поколение, полученное путем скрещивания двух инбредных родительских линий. Таким образом, гибридные семена F1 представляют собой семена, из которых выращиваются

гибридные растения F1. Гибриды F1 обладают большей мощностью, они дают больший урожай из-за гетерозиса. Инбредные линии преимущественно гомозиготны в большинстве локусов в геноме.

Термин «растительная линия» или «линия скрещивания» относится к растению и его потомству. При использовании по тексту настоящего документа термин «инбредная линия» относится к растительной линии, которая была получена путем повторного самоопыления и является практически гомозиготной. Таким образом, термины «инбредная линия» или «родительская линия» относятся к растению, несколько поколений которого подверглось инбридингу (например, по меньшей мере, 5, 6, 7 или более поколений), в результате чего получают линию растений с высокой однородностью.

Термин «ген» означает последовательность (геномной) ДНК, включающую область (транскрибируемую область), которая транскрибируется в молекулу матричной РНК (мРНК) в клетке, и функционально связанную регуляторную область (например, промотор). Примером является ген WAP5.1 по изобретению. Таким образом, разные аллели гена представлены его альтернативными формами, которые могут иметь форму, например, различий по одному или нескольким нуклеотидам геномной последовательности ДНК (например, в промоторной последовательности, в последовательностях экзона, интрона и т.д.), по мРНК и/или аминокислотной последовательности кодированного белка.

Термин «мутантный аллель *wap5.1*» или «*аллель wap5.1*» в настоящем документе относится к мутантному аллелю гена WAP5.1 на хромосоме 5 арбуза, который делает растение факультативным партенокарпическим, если мутантный аллель находится в гомозиготной форме. Мутация в мутантном аллеле может быть представлена любой мутацией или комбинацией мутаций, включая делеции, усечения, вставки, точечные мутации, бессмысловые мутации, ошибочные мутации или несинонимичные мутации, мутации сайта сплайсинга, мутации сдвига рамки считывания и/или мутации в одной или более регуляторных последовательностях, таких как последовательность промотора, энхансера или сайленсера. В одном аспекте мутантный аллель *wap5.1* представляет собой мутантный аллель гена WAP5.1, при этом ген WAP5.1 представляет собой ген, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или кодирующий белок, имеющий, по меньшей

мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9 (при попарном выравнивании). Это включает в одном аспекте мутантные аллели ортологов гена WAP5.1 у огурца (SEQ ID NO: 2) и дыни (SEQ ID NO: 3), присутствующие в растениях или клетках огурца или дыни.

Термин «аллель *WAP5.1* дикого типа» или «аллель *WAP5.1*» в настоящем документе относится к функциональному аллелю гена WAP5.1, который вызывает у растения нормальное завязывание плодов, требующее нормального опыления и оплодотворения для завязывания плодов. Аллель *WAP5.1* дикого типа имеется в любом коммерческом сорте арбуза (например, сорт Nunhems Premium F1, Montreal F1 и другие). В одном аспекте аллель *WAP5.1* дикого типа представляет собой аллель дикого типа гена WAP5.1, причем ген WAP5.1 представляет собой ген, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или кодирующий белок, имеющий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9 (при попарном выравнивании). Это включает в одном аспекте ортологи гена WAP5.1 у огурца (SEQ ID NO: 2) и дыни (SEQ ID NO: 3), присутствующие в растениях или клетках огурца или дыни.

Термин «локус» означает определенное место или места, или участок на хромосоме, где находится, например, ген или генетический маркер. Таким образом, локус WAP5.1 представляет собой место в геноме арбуза, где находится мутантный аллель и/или аллель дикого типа гена WAP5.1. Локус WAP5.1 представляет собой локус на хромосоме 5 культурного арбуза (с использованием распределения хромосом опубликованного генома арбуза, который представлен на сайте cucurbitgenomics.org в разделе «Арбуз: Геном», «Чарльстон Грей» или «арбуз 97103», т.е. *wap5.1* был создан в геноме культурного арбуза путем мутагенеза, и мутантный аллель *wap5.1* был картирован в определенной области хромосомы 5 культивируемого арбуза.

«Индукцированные мутантные» аллели представляют собой мутантные аллели, в которых мутация(и) индуцируется вмешательством человека, например, путем мутагенеза с помощью методов физического или химического мутагенеза или, например, с помощью культуры ткани (как описано, например, в Zhang et al,

Plos 9(5) e96879), включая методы целенаправленного редактирования генов (такие как методы на основе Crispr, TALENS и т.д.).

«Диплоидное растение» относится к растению, вегетативной(ым) части(ям) растения или семени, из которого может быть выращено диплоидное растение, имеющее два набора хромосом, в настоящем документе обозначенное как 2n.

«ДН-растение» или «удвоенно-гаплоидное растение» представляет собой диплоидное растение, полученное путем удвоения гаплоидного генома диплоидного растения с использованием, например, методов *in vitro*. Таким образом, ДН-растение по всем локусам является гомозиготным.

Термин «триплоидное растение» относится к растению, вегетативной(ым) части(ям) растения или семени, из которого может быть выращено триплоидное растение, имеющее три набора хромосом, в настоящем документе обозначенное как 3n.

Термин «тетраплоидное растение» относится к растению, вегетативной(ым) части(ям) растения или семени, из которого может быть выращено тетраплоидное растение, имеющее четыре набора хромосом, в настоящем документе обозначенное как 4n.

Термин «полиплоидное растение» относится к растениям, имеющим более высокую ploidy, чем диплоидная, т.е. триплоид (3n), тетраплоид (4n), гексаплоид (6n), октаплоид (8n) и т.д.

Термин «растение-опылитель» или «опылитель» относится к (инбредному или гибриднему) диплоидному растению или его частям (например, к его пыльце или отрубку), подходящим в качестве опылителя для начала завязывания плодов на триплоидных растениях. Таким образом, растение-опылитель способно обеспечить хорошее завязывание плодов (и хороший выход триплоидных плодов) у нормальных триплоидных растений (содержащих три копии аллеля WAP5.1 дикого типа), производя соответствующее количество пыльцы в соответствующее время суток в течение соответствующего периода времени.

Термин «гибридное триплоидное растение» или «триплоид F1» или «триплоидный гибрид» представляет собой триплоидное растение, выращенное из гибридного триплоидного семени, полученного в результате перекрестного оплодотворения диплоидного мужского растения с тетраплоидным родительским

растением женского пола. Мужской родитель используется для индукции завязывания плодов и производства семян на тетраплоидном женском родителе, в результате чего получают плоды, содержащие гибридные триплоидные семена F1. И мужской, и женский родитель, используемые для получения триплоидных семян F1, являются инбредными, и поэтому обе родительских линии является практически гомозиготными и стабильными.

«Бессемянные плоды» – это плоды, не содержащие жизнеспособных зрелых семян. Плод может содержать один или более маленьких съедобных белых семязачатков, например, как показано на Фигуре 1 или Фигуре 5. При необходимости, плод может содержать несколько коричневых или черных семян, но они нежизнеспособны. Жизнеспособные зрелые семена – это семена, которые могут прорасти в почве при соответствующих условиях и превратиться в растения.

Термин «посев» или «высаженный» относится к посеву (прямому посеву) или пересадке сеянцев (проростков) в поле машинным или ручным способом.

«Вегетативное размножение» или «клональное размножение» относится к размножению растений из вегетативной ткани, например, способами размножения *in vitro* или прививки (с использованием черенков и подвоев). Размножение в искусственных условиях включает культуру клетки или ткани в искусственных условиях и регенерацию всего растения из культуры в искусственных условиях. Прививка включает размножение исходного растения путем прививки на подвой. Таким образом, клоны (т.е., генетически идентичные виды растительного размножения) первоначального растения могут вырабатываться культурой в искусственных условиях или посредством прививки. «Культура клетки» или «культура ткани» относится к культуре клеток или тканей растений *in vitro*. «Регенерация» относится к развитию растения из культуры клетки или культуры ткани или к вегетативному размножению. «Неспособная к размножению клетка» представляет собой клетку, которую нельзя регенерировать в целое растение.

Термин «рецессивный» относится к аллелю, который экспрессирует свой фенотип (например, партенокарпия или факультативная партенокарпия), когда в диплоидном геноме отсутствует доминантный аллель, т.е. когда в диплоидном геноме он является гомозиготным. Наличие мутантного аллеля *warp5.1* приводит к

(факультативному) появлению партенокарпиевого растения, если он присутствует в двух копиях в диплоидном растении, при необходимости, в четырех копиях в тетраплоидном растении или в двух или трех копиях в триплоидном растении, или в соответствующем количестве копий в другой полиплоидном растении. Доминантный аллель также в настоящем документе называется аллелем дикого типа (АДТ).

«Культурный арбуз» или «*Citrullus lanatus*» в настоящем документе относится к *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*, или *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai, подвид. *Vulgaris* (Schrad.), обладающему хорошими агрономическими характеристиками, в особенности дающему товарные плоды хорошего качества и однородности. Культурный огурец и культурная дыня относятся к растениям *Cucumis sativus* и *Cucumis melo*, обладающим хорошими агротехническими характеристиками, в частности, дающими товарные плоды хорошего качества и однородности.

«Дикий арбуз» в настоящем документе относится к *Citrullus lanatus* ssp. *lanatus* и *Citrullus lanatus* ssp. *mucosospermus*, дающему плоды низкого качества и плохой однородности.

«Маркер SNP» относится к однонуклеотидному полиморфизму, например, между мутантным аллелем *wap5.1* и аллелем *WAP5.1* дикого типа. Например, SEQ ID NO: 8 обеспечивает наличие последовательности, содержащей ОНП в нуклеотиде 61, при этом присутствие «С» (цитозин) указывает на присутствие аллеля *WAP5.1* дикого типа, а присутствие «Т» (тимин) указывает на наличие мутантного аллеля, который кодирует белок SEQ ID NO: (мутация L528F). Используя анализ маркера ОНП, который позволяет различать мутантный аллель гена *WAP5.1* и аллель дикого типа (т.е. аллель-специфический анализ), можно проводить скрининг растений, частей растений или их ДНК на присутствие в них мутантного аллеля и/или дикого типа.

«Маркер INDEL» относится к полиморфизму инсерции/делеции, например, между мутантным аллелем *wap5.1* и аллелем *WAP5.1* дикого типа. Используя анализ маркера INDEL, который позволяет различать мутантный аллель гена и аллель дикого типа (т.е. аллель-специфический анализ), можно проводить

скрининг растений, частей растений или их ДНК на присутствие мутантного аллеля.

Методы «генотипирования» представляют собой методы, с помощью которых можно определить генотип или аллельный состав растения, части растения или семени. Биаллельные анализы генотипирования, такие как KASP-анализы, могут различать два аллеля в локусе.

«Геном культурного арбуза» и «физическое положение в геноме культурного арбуза» и «хромосома 5» относятся к физическому геному культурного арбуза, эталонный геном можно найти на сайте cucurbitgenomics.org в разделе «Арбуз: геном», например, «Арбуз (Чарльстон Грей)», а также к физическим хромосомам и физическому положению на хромосомах.

«Область хромосомы, содержащая мутантный аллель *wap5.1*» относится к геномной области, например, хромосомы 5 культурного арбуза, который несет мутантный аллель *wap5.1*. Наличие аллеля можно определить фенотипически и/или по наличию одного или более молекулярных маркеров, например, маркеров ОНП или других маркеров, сцепленных с мутантным аллелем *wap5.1*, или предпочтительно маркеров, отличающих разные аллели *wap5.1*, или по геномной последовательности самой последовательности аллеля (например, секвенирование аллеля). Маркер «связан с аллелем *wap5.1*», если объединен с ним физически. «Аллель-специфический маркер» представляет собой маркер, который специфичен для конкретного аллеля (например, конкретного мутантного аллеля) и, таким образом, позволяет различать, например, мутантный аллель и аллель дикого типа.

Пара «фланкирующих маркеров» относится к двум маркерам, предпочтительно двум маркерам ОНП или двум последовательностям, содержащим маркеры ОНП, которые связаны с аллелем *wap5.1*, и/или которые тесно связаны с аллелем *wap5.1*, посредством чего аллель *wap5.1* расположен между двумя маркерами или между двумя последовательностями, содержащими эти маркеры.

Термины «содержание сухих веществ по ареометру Брикса» или «градус Брикса» или «брикс» относятся к среднему общему содержанию растворимых сухих веществ, которое измеряется в нескольких зрелых плодах с помощью

рефрактометра. Предпочтительно рассчитывается среднее значение, по меньшей мере, для трех плодов, при этом измерения производятся в точке между центром и кожурой разрезанных плодов.

«Обладать рыночной ценностью» в отношении качества плода означает, что плоды арбуза пригодны для продажи для употребления в пищу в свежем виде, они имеют хороший запах (посторонние запахи отсутствуют), градус Брикса составляет, по меньшей мере, 9,0, предпочтительно, по меньшей мере, 10,0 или, по меньшей мере, 11,0, и предпочтительно у них также равномерный цвет мякоти плода, например, белый (например, сорт Cream of Saskatchewan), желтый (например, сорт Yamato Cream 1), оранжевый (например, сорт Tendersweet), розовый (например, сорт Sadul), розовато-красный (например, сорт Crimson Sweet), красный (например, сорт Sugar Baby) или темно-красный (например, сорт Dixie Lee).

Выражение «равномерный цвет мякоти плода» означает, что цвет всего зрелого плода при разрезании через середину (срединный разрез) является однородным по всей мякоти плода, то есть отсутствуют какие-либо пятна. Так, красный плод имеет красный цвет по всей мякоти плода и не содержит белых пятен. Примером плода с равномерным красным цветом является диплоидный сорт Premium F1 (компания Nunhems).

«Физическое расстояние» между локусами (например, между молекулярными маркерами и/или между фенотипическими маркерами) на одной и той же хромосоме – это реальное расстояние, выраженное в основаниях или парах оснований (п.о.), килобазах или тысячах пар оснований (тыс. п.о.) или в мегабазах или миллионах пар оснований (млн п.о.).

«Генетическое расстояние» между локусами (например, между молекулярными маркерами и/или между фенотипическими маркерами) на той же хромосоме измеряется частотой событий кроссинговера или рекомбинантной частотой (РЧ) и указывается в сантиморганах (сМ). Один сМ соответствует частоте рекомбинации около 1%. Если рекомбинанты отсутствуют, то значение РЧ равно нулю, и локусы либо расположены очень близко друг к другу физически, либо являются идентичными. Чем больше расстояние между двумя локусами, тем выше значение РЧ.

Термин «однородность» или «однородный» относится к генетическим и фенотипическим характеристикам линии или сорта растений. Инбредные линии генетически высоко однородны, так как их получают в нескольких поколениях в результате инбридинга. Аналогичным образом, и гибриды F1, и триплоидные гибриды, которые получены из таких инбредных линий, являются высокооднородными по своим генотипическим и фенотипическим характеристикам и свойствам.

Генетический элемент, фрагмент интрогрессии, ген или аллель, придающий признак (например, партенокарпию), считается «полученным из», или может быть «получен из», или «происходит из», или может «происходить из» или «происходит от» или «присутствует в» или «имеется в» растении, семени, ткани или клетке, если он может быть перенесен из растения или семени, в котором он присутствует, в другое растение или семя, в котором он отсутствует (например, непартенокарповой линии или сорта) с использованием традиционных методов селекции, не приводящих к фенотипическому изменению растения-реципиента, за исключением добавления признака, придаваемого генетическим элементом, локусом, фрагментом интрогрессии, геном или аллелем. Таким образом эти термины используются взаимозаменяемо, и генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, ген или аллель могут быть перенесены в любой другой генетический фон, в котором отсутствует признак. Культурные арбузы, содержащие генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, ген или аллель (например, мутантный аллель *wap5.1*), могут быть получены *de novo*, например, путем мутагенеза (например, химический мутагенез, индуцированный CRISPR-Cas и т.д.), а затем, например, скрещены с другими культурными арбузами. То же самое относится к огурцу и дыне, т.е. мутантные аллели *wap5.1* могут быть получены *de novo* путем мутагенеза.

Термин «среднее» относится в данном документе к среднему арифметическому. Таким образом, термин «среднее» относится к среднему арифметическому нескольких измерений. Специалисту в данной области понятно, что фенотип линии или сорта растений в некоторой степени зависит от условий выращивания и что, следовательно, средние арифметические значения, по меньшей мере, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или более растений (или частей растений) измерены, предпочтительно в случайных экспериментальных планах с несколькими

повторениями с использованием подходящих контрольных растений, выращенных в тех же условиях в одном и том же эксперименте. «Статистически значимый» или «статистически значимо» отличающийся или «значительно» отличающийся относится к характеристике линии или сорта растения, которая, по сравнению с приемлемым контролем, показывает статистически значимое различие в этой характеристике (например, значение p меньше чем 0,05, $p < 0,05$, с использованием ANOVA) из (среднего) контроля.

Термин «традиционные методы селекции» в настоящем документе охватывает скрещивание, обратное скрещивание, самоопыление, селекцию, образование двойных гаплоидов, удвоение хромосом, спасение эмбрионов, слияние протопластов, селекцию с помощью маркеров, мутационную селекцию и т.д., все из которых известны селекционеру (т.е. методы, отличные от генетической модификации/трансформации/трансгенных методов), с помощью которых, например, может быть получена, идентифицирована и/или перенесена хромосома 5, содержащая мутантный аллель *wap5.1*.

«Обратное скрещивание» относится к методу селекции, с помощью которого (одионый) признак, такой как факультативный признак партенокарпии, может быть перенесен из одного (часто низшего) генетического фона (также называемого «донором») в другой (часто высший) генетический фон (также называемый «рекуррентным родителем»). Потомство скрещивания (например, растение F1, полученное путем скрещивания, например, донора с рекуррентным родительским арбузом, или растение F2 или растение F3 и т.д., полученное в результате самоопыления растения F1) получено «обратным скрещиванием» с родителем, например, с высшим генетическим фоном. После повторного обратного скрещивания признак одного (часто низшего) генетического фона будет включен в другой (часто высший) генетический фон.

Молекулярный маркер (или последовательность, содержащая молекулярный маркер) в пределах 5 Мб, 3 Мб, 2,5 Мб, 2 Мб, 1 Мб, 0,5 Мб, 0,4 Мб, 0,3 Мб, 0,2 Мб, 0,1 Мб, 74 кб, 50 кб, 20 кб, 10 кб, 5 кб, 2 кб, 1 кб или менее другого маркера (или последовательности, содержащей молекулярный маркер) или локуса, относится к маркеру, который физически расположен в пределах 5 Мб, 3 Мб, 2,5 Мб, 2 Мб, 1 Мб, 0,5 Мб, 0,4 Мб, 0,3 Мб, 0,2 Мб, 0,1 Мб, 74 кб, 50 кб, 20 кб, 10 кб, 5

кб, 2 кб, 1 кб или менее участка геномной ДНК, фланкирующего маркер (т.е. с любой стороны маркера).

«LOD-балл» (количественный показатель сцепления генов (основание логарифма – 10) означает показатель, который получают с использованием статистического теста для анализа сцепления в популяциях животных и растений. LOD-балл используется для сравнения вероятности получения данных теста, если два локуса (локусы молекулярных маркеров и/или локус фенотипического признака) действительно связаны, с вероятностью наблюдения тех же данных чисто случайно. Положительный LOD-балл свидетельствует о высокой вероятности наличия сцепления, а LOD-балл 3,0 рассматривается как доказательство наличия сцепления. LOD-балл +3 означает, что вероятность того, что наблюдаемая связь возникла случайно, составляет 1000 к 1.

Термин «трансген» или «химерный ген» относится к генетическому локусу, содержащему последовательность ДНК, такому как рекомбинантный ген, который был введен в геном растения посредством трансформации, такой как трансформация с помощью *Agrobacterium*. Растение, содержащее трансген, стабильно интегрируемый в свой геном, называется «трансгенным растением».

«Изолированная нуклеотидная последовательность» или «изолированная ДНК» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая больше не находится в природной среде, откуда она была выделена, например, к последовательности нуклеиновой кислоты в бактериальной клетке-реципиенте или в ядерном или пластидном геноме растения. При упоминании по тексту «последовательности» в настоящем документе подразумевается, что молекула, имеющая такую последовательность, относится, например, к молекуле нуклеиновой кислоты.

Термины «клетка-хозяин», «рекомбинантная клетка-хозяин» или «трансформированная клетка» относятся к новой индивидуальной клетке (или организму), возникающей в результате введения в указанную клетку, по меньшей мере, одной молекулы нуклеиновой кислоты. Клетка-реципиент - это предпочтительно растительная клетка или бактериальная клетка. Клетка-хозяин может содержать нуклеиновую кислоту в виде внехромосомной (эпизомальной) реплицирующейся молекулы или нуклеиновую кислоту, интегрированную в

ядерный или плазмидный геном клетки-хозяина, или в виде введенной хромосомы, например, минихромосомы.

«Идентичность последовательности» и «сходство последовательности» можно определить путем выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритмов глобального или локального выравнивания. Затем последовательности могут называться «существенно идентичными» или «в значительной степени идентичными», когда они оптимально выровнены, например, с помощью программ GAP или BESTFIT или программы Emboss «Needle» (с использованием параметров по умолчанию, см. ниже) и имеют, по меньшей мере, определенный минимальный процент идентичности последовательности (как определено ниже). Эти программы используют алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей длине, получая максимальное количество совпадений и сводя к минимуму количество делеций. Обычно используются параметры по умолчанию, штраф на внесение делеции = 10, штраф на продолжение делеции = 0,5 (как для выравнивания нуклеотидных последовательностей, так и выравнивания последовательностей белков). Для нуклеотидов по умолчанию используется матрица замен DNAFULL, а для белков – Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 10915-10919). Выравнивания последовательности и показатели процента идентичности последовательности, например, могут быть определены с помощью компьютерных программ, таких как EMBOS, которая доступна по адресу: ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). В качестве альтернативы процент сходства или идентичности может определяться путем поиска в базах данных, таких как FASTA, BLAST и т.д., однако для сравнения идентичности последовательности совпадения должны быть получены и приведены в соответствие попарно. Два белка или два белковых домена или две нуклеотидные последовательности имеют «существенную идентичность последовательности», если процент идентичности последовательности составляет, по меньшей мере, 85%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% или более (в соответствии с определением для программы Needle (пакет Emboss) с использованием параметров по умолчанию, т.е.: штраф на внесение делеции = 10, штраф на продолжение делеции = 0,5, с использованием матрицы замен DNAFULL для нуклеиновых кислот и Blosum62 для белков).

При упоминании по тексту нуклеотидной последовательности (например, ДНК или геномной ДНК) с «существенной идентичностью последовательности» с эталонной последовательностью или идентичный, по меньшей мере, на 80%, например, по меньшей мере, на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,9% с эталонной последовательностью, в соответствии с одним вариантом реализации изобретения считается, что указанная нуклеотидная последовательность имеет существенную идентичность последовательности с определенной нуклеотидной последовательностью и может быть идентифицирована с использованием жестких условий гибридизации. В еще одном варианте реализации изобретения нуклеотидная последовательность содержит одну или более мутаций, по сравнению с определенной нуклеотидной последовательностью, однако она все же может быть идентифицирована с использованием жестких условий гибридизации.

«Жесткие условия гибридизации» используются для идентификации нуклеотидных последовательностей, которые существенно идентичны определенной нуклеотидной последовательности. Жесткость условий зависит от определенной последовательности и в различных случаях будет различной. Обычно жесткие условия означает следующее: температура составляет на 5°C ниже точки плавления (T_m) для определенной последовательности при определенной ионной силе и pH. T_m – это температура (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% целевой последовательности гибридизует с подобранным зондом. Обычно жесткие условия будут выбраны таким образом, что концентрация солей составляет приблизительно 0,02 моль при pH 7 и температуре, по меньшей мере, 60°C. Снижение концентрации солей и/или повышение температуры увеличивает жесткость условий. Жесткие условия для РНК-ДНК гибридизации (нозерн-блоттинг с использованием, например, зонда длиной 100 нуклеотидов) представляют собой, например, такие условия, которые включают, по меньшей мере, одну промывку в 0,2 x SSC при 63°C в течение 20 минут, или эквивалентные условия. Жесткие условия для ДНК-ДНК гибридизации (Саузерн-блоттинг с использованием, например, зонда длиной 100 нуклеотидов) представляют собой, например, такие условия, которые включают, по меньшей мере, одну промывку (как правило, две промывки) в 0,2 x SSC, по меньшей мере,

при 50°C, как правило, приблизительно, 55°C, в течение 20 минут, или эквивалентные условия.

Термин «поколение M1» или «растения M1» в контексте настоящего изобретения относится к первому поколению, которое получают непосредственно в результате мутагенной обработки. Представителем поколения M1, например, является растение, выращенное из семян, обработанных мутагеном.

В настоящем документе термины «поколение M2» или «растение M2» относятся к поколению, полученному в результате самоопыления поколения M1. Растение, выращенное из семян, полученных в результате самоопыления растения M1, представляет собой растение M2. M3, M4 и т.д. относятся к последующим поколениям, полученным после самоопыления.

«Тест на аллелизм» относится к генетическому тесту, с помощью которого можно проверить, определяется ли фенотип, например, факультативная партенокарпия, наблюдаемый у двух линий или сортов растений, одним и тем же геномом или локусом или разными генами или локусами. Например, тестируемые растения скрещивают друг с другом (предпочтительно после самоопыления, чтобы убедиться, что они гомозиготны), определяют сегрегацию фенотипов среди потомства F1 или дальнейшего самоопыления или обратного скрещивания. Коэффициент сегрегации указывает на то, являются ли гены или локусы аллельными или они разные. Так, например, если аллели относятся к одному и тому же гену, растения F1 (полученные путем скрещивания двух гомозиготных растений) будут все (100%) иметь одинаковый фенотип, в то время как это может быть и не так, если аллели относятся к разным генам. Точно так же у растений F2 фенотипическая сегрегация будет указывать на то, задействованы ли в них одни и те же или разные гены.

В настоящем документе термин «кодирующая последовательность мРНК» употребляется в общепринятом значении. Кодированная последовательность мРНК соответствует соответствующей кодирующей (кДНК) последовательности ДНК гена/аллеля, за исключением того, что тимин (Т) заменен урацилом (U).

«Мутация» в молекуле нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) представляет собой изменение одного или более нуклеотидов, по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа, например, путем замены, удаления или вставки

одного или более нуклеотидов. Примерами таких мутаций являются точечная мутация, нонсенс-мутация, миссенс-мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация со сдвигом рамки или мутация в регуляторной последовательности.

Термин «молекула нуклеиновой кислоты» употребляется в обычном значении, известном в данной области. Молекула нуклеиновой кислоты состоит из нуклеотидов и содержит сахара: ДНК – дезоксирибозу, а РНК – рибозу.

«Точечная мутация» представляет собой замену одного нуклеотида, или вставку или удаление одного нуклеотида.

«Нонсенс-мутация» – это (точечная) мутация в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, в результате чего кодон в молекуле нуклеиновой кислоты превращается в терминирующий кодон. Это приводит к тому, что в мРНК присутствует преждевременный стоп-кодон, а также к трансляции усеченного белка. Усеченный белок может иметь сниженную функцию или потерю функции.

«Миссенс-мутация» или «несинонимичная мутация» – это (точечная) мутация в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, в результате которой кодон кодирует другую аминокислоту. Полученный белок может иметь сниженную функцию или потерю функции.

«Мутация сайта сплайсинга» – это мутация в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, в результате чего происходит изменение РНК сплайсинга пре-мРНК, в результате чего получают мРНК с другой нуклеотидной последовательностью и белок с другой аминокислотной последовательностью, по сравнению с мРНК и белком дикого типа. Полученный белок может иметь сниженную функцию или потерю функции.

«Мутация со сдвигом рамки» – это мутация в нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, в результате которой происходит изменение рамки считывания мРНК, что приводит к получению другой аминокислотной последовательности. Полученный белок может иметь сниженную функцию или потерю функции.

В контексте изобретения термин «делеция» означает, что, по сравнению с соответствующей нуклеотидной последовательностью дикого типа, в определенном месте в данной нуклеотидной последовательности отсутствует, по

меньшей мере, один нуклеотид или в данной аминокислотной последовательности отсутствует, по меньшей мере, одна аминокислота, по сравнению с соответствующей аминокислотной последовательностью дикого типа.

Термин «усечение» означает, что, по сравнению с соответствующей нуклеотидной последовательностью дикого типа, на 3'-конце или 5'-конце нуклеотидной последовательности отсутствует, по меньшей мере, один нуклеотид или что, по сравнению с аминокислотной соответствующего белка дикого типа на N-конце или на C-конце белка отсутствует, по меньшей мере, одна аминокислота, при этом при усечении на 3'-конце или C-конце, по меньшей мере, первый нуклеотид все еще присутствует на 5'-конце или, соответственно, первая аминокислота все еще присутствует на N-конце, а при усечении на 5'-конце или N-конце, по меньшей мере, последний нуклеотид все еще присутствует на 3'-конце или, соответственно, последняя аминокислота все еще присутствует на C-конце. 5'-конец определяется кодоном ATG, который используется в качестве старт-кодона при трансляции соответствующей нуклеотидной последовательности дикого типа.

Термин «замена» означает, что, по меньшей мере, один нуклеотид в нуклеотидной последовательности или одна аминокислота в белковой последовательности отличаются, по сравнению с соответствующей нуклеотидной последовательностью дикого типа или, соответственно, соответствующей аминокислотной последовательностью дикого типа, из-за замены нуклеотида в кодирующей последовательности соответствующего белка.

Термин «вставка» означает, что нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность содержит, по меньшей мере, один дополнительный нуклеотид или аминокислоту, по сравнению с соответствующей нуклеотидной последовательностью дикого типа или, соответственно, соответствующей аминокислотной последовательностью дикого типа.

В контексте настоящего изобретения термин «преждевременный стоп-кодон» означает, что стоп-кодон присутствует в кодирующей последовательности (cds), которая ближе к старт-кодону на 5'-конце, по сравнению со стоп-кодоном соответствующей кодирующей последовательности дикого типа.

«Мутация в регуляторной последовательности», например, в промоторе или энхансере гена – это изменение одного или более нуклеотидов, по сравнению с

последовательностью дикого типа, например, путем замены, удаления или вставки одного или более нуклеотидов, что приводит, например, к снижению или к отсутствию мРНК-транскрипта гена.

«Мутация в белке» – это изменение одного или более аминокислотных остатков, по сравнению с последовательностью дикого типа, например, путем замены, делеции, усечения или вставки одного или более аминокислотных остатков.

«Мутантный белок» в настоящем документе представляет собой белок, содержащий одну или более мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, в результате чего мутация приводит к (мутантной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей) белку с «уменьшенной функцией» или «потере функции», например, поддающийся измерению *in vivo*, например, по фенотипу, который передается мутантным аллелем.

«Трехмерная структура дикого типа» или «сворачивание белка дикого типа» относятся к сворачиванию белка дикого типа *in vivo* для выполнения его нормальной функции *in vivo*. «Модифицированная трехмерная структура или модифицированная укладка белка» относится к мутантному белку, имеющему укладку, отличную от структуры белка дикого типа, что снижает или устраняет его нормальную функцию или активность *in vivo*, т.е. белок характеризуется пониженной функцией или потерей функции.

В контексте настоящего изобретения «сниженная активность» белка означает уменьшение активности белка WAP5.1, по сравнению с соответствующей клеткой растения дикого типа или соответствующим растением дикого типа. Снижение в одном аспекте должно включать полный нокаут или нокадаун экспрессии гена, или производство белка WAP5.1 с потерей функции или с ее понижением, например, мутантный белок WAP5.1 может характеризоваться потерей функций или ее понижением, по сравнению с функциональным белком WAP5.1 дикого типа. Понижение активности может происходить в результате снижения экспрессии гена, кодирующего белок WAP5.1 (также называемое нокадауном), или нокаута экспрессии гена, кодирующего белок WAP5.1, и/или уменьшения количества белка WAP5.1 в клетках, или же понижения или потери функции активности белка WAP5.1 в клетках.

В контексте настоящего изобретения термин «клетка растения дикого типа» или «растение дикого типа» означает, что они содержат аллели *wap5.1* дикого типа, а не мутантные аллели *wap5.1*. Таким образом, растение дикого типа или растительная клетка дикого типа представляет собой растение или растительную клетку, содержащую полностью функциональные гены WAP5.1, кодирующие полностью функциональные белки WAP5.1 (также называемые белком WAP5.1 дикого типа), например, в отношении растений арбуза или растительных клеток диплоидного растения арбуза, производящего белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9) и дающего плоды только после опыления. Или в отношении растений или клеток дыни диплоидное растение дыни, производящее белок SEQ ID NO: 3 (или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3) или в отношении растений огурца или клеток диплоидного растения огурца, производящего белок SEQ ID NO: 2 (или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2).

Под «нокаутом» или «полным нокаутом» подразумевается, что экспрессия соответствующего гена более не поддается обнаружению.

«Потеря функции» или «пониженная функция» или «уменьшенная функция» в контексте настоящего изобретения означают, что белок, хотя он и может присутствовать в количествах, равных или сходных с соответствующим белком дикого типа, больше не вызывает своей нормальной активности, т.е. для мутантных аллелей, кодирующих такой белок, когда они присутствуют в гомозиготной форме в диплоидном растении, растение дает бессемянные плоды в отсутствие опыления и плоды с семенами при наличии опыления.

«Консервативный домен» относится к консервативным белковым доменам, таким как «домен LRR» и «домен F», оба из которых, вероятно, участвуют в межбелковых взаимодействиях. В белке WAP5.1 арбуза SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 домен F-бок обнаружен в аминокислотах с 237 по 277, в белке WAP5.1 огурца SEQ ID NO: 2 он обнаружен в аминокислотах с 244 по 284, а в белке дыни SEQ ID NO: 3 он обнаружен в аминокислотах с 247 по 287. В белке WAP5.1 арбуза SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 домен LRR обнаружен в аминокислотах с 291 по

1033, в белке огурца WAP5.1 SEQ ID NO: 2 он обнаружен в аминокислотах с 297 по 1040, а в белке дыни SEQ ID NO: 3 в аминокислотах с 301 по 1043. Консервативные домены приводятся, например, в базе данных охраняемых доменов Национального центра биотехнологической информации (по адресу ncbi.nlm.nih.gov/cdd).

«Маркерная селекция» или «МС» представляет собой процесс использования присутствия молекулярных маркеров (таких как маркеры ОНП или маркеры INDEL), которые генетически и физически связаны с определенным локусом или областью хромосомы или аллель-специфическими маркерами, для отбора растений, в которых имеется определенный локус, область или аллель. Например, молекулярный маркер, генетически и физически связанный с мутантным аллелем *wap5.1*, или аллель-специфический маркер можно использовать для обнаружения и/или отбора, например, растений арбуза или частей растения, содержащих мутантный аллель *wap5.1*. Аллель-специфические маркеры являются предпочтительными, поскольку они выбирают аллель напрямую.

«Редактирование целевого гена» относится к методам, с помощью которых можно модифицировать эндогенные целевые гены, например, один или более нуклеотидов можно вставить, заменить и/или удалить, например, в промоторной или кодирующей последовательности. Например, методы на основе CRISPR, такие как редактирование генов Crispr-Cas9, редактирование генов Crispr-CpfI или более современные методы, называемые «редактированием основания» или «редактированием праймера», могут использоваться для модификации эндогенных целевых генов, таких как эндогенный ген дикого типа WAP5 арбуза (кодирующий белок SEQ ID NO: 1 или 9, или белок дикого типа, встречаемость, по меньшей мере, 95% идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9). Описанные в настоящем документе мутанты можно, например, воспроизвести путем целенаправленного редактирования гена WAP5.1 дикого типа.

«Олигонуклеотиды» или «олиго», или «олигонуклеотидные праймеры или зонды» представляют собой короткие одноцепочечные полимеры нуклеиновой кислоты, например, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и более нуклеотидов в длину. Олигонуклеотиды могут быть немодифицированы или модифицированы разнообразными химическими веществами в зависимости от их предполагаемого использования, например,

добавление 5'- или 3'-фосфатных групп для возможности лигирования или блокирования удлинения, соответственно, маркировка радионуклидами или флуорофорами и/или гасителями для использования в качестве зондов, включение тиоловых, amino или других реакционноспособных фрагментов для обеспечения ковалентного связывания функциональных молекул, таких как ферменты, и удлинение с другими линкерами и спейсерами различной функциональности. Чаще всего используются олигонуклеотиды ДНК, но также доступны олигонуклеотиды РНК. Длину олиго обычно обозначают добавлением суффикса -мер. Например, олигонуклеотид с 19 нуклеотидами (основаниями) называется 19-мером. В большинстве областей применения олигонуклеотиды предназначены для образования пар оснований с цепью ДНК или РНК. Чаще всего олигонуклеотиды используются в качестве праймеров для ПЦР (полимеразной цепной реакции). Праймеры устроены так, что, по меньшей мере, часть их последовательности комплементарна последовательности, предназначенной для амплификации. Оптимальная длина праймера для комплементарной последовательности составляет, например, от 18 до 22 нуклеотидов. Оптимальные последовательности праймеров для ПЦР обычно определяются с помощью программного обеспечения для создания праймеров.

«ДНК-микрочипы» представляют собой пластины, содержащие множество микроскопических пятен ДНК, обычно олигонуклеотидов, связанных на твердой подложке. Целью анализа могут быть ДНК, кДНК или кРНК. В зависимости от системы гибридизация мишеней с определенными пятнами обнаруживается по флуоресценции, хемилюминесценции или коллоидному серебру или золоту. Микрочипы используются в большом количестве областей применения, таких как одновременное измерение экспрессии большого количества генов, что позволяет анализировать экспрессию генов в масштабах всего генома, а также исследования генотипирования с использованием, например, однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) или анализа InDel.

«Комплементарные цепи» относятся к двум цепям комплементарной последовательности и могут называться смысловыми (или плюс) и антисмысловыми (или минус) цепями для двухцепочечной ДНК. Смысловая/плюс-цепь, как правило, представляет собой транскрибируемую последовательность ДНК (или мРНК, полученную при транскрипции), тогда как антисмысловая/минус-

цепь представляет собой цепь, комплементарную смысловой последовательности. Для любой из представленных в настоящем документе последовательностей приводится только одна цепь последовательности, но в документе также рассматривается и комплементарная цепь данной цепи. Комплементарными нуклеотидами ДНК являются А, комплементарный Т, и G, комплементарный С. Комплементарными нуклеотидами РНК являются А, комплементарный U, и G, комплементарный С.

Фигура 1: Фотография поперечного среза плода арбуза, развивавшегося в отсутствие опыления на растении, гомозиготном по мутантному аллелю *wap5.1*, кодирующему белок, в котором аминокислота лейцин в положении 528 заменена аминокислотой фенилаланин (L528F).

Фигура 2: Выравнивание белковой последовательности белка WAP5.1 арбуза дикого типа (обозначенного как «wt»), содержащего аминокислоту лейцин (L) в позиции аминокислоты 528, и мутантного белка WAP5.1 (обозначенного как «wap5.1»), содержащего фенилаланин (F) в позиции аминокислоты 528. Также, домен F-box обозначен сплошной линией, а домен LRR пунктирной линией.

Фиг. 3А трехмерная структура белка WAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 1, полученная с помощью RaptorX Contact Prediction. Аминокислота лейцин 528 указана стрелкой. Домен LRR сворачивается, после чего имеет структуру в виде длинного хвоста.

Фиг. 3В трехмерная структура мутантного белка WAP5.1 SEQ ID NO: 4, содержащего фенилаланин в положении 528 (вместо лейцина), полученная с помощью RaptorX Contact Prediction. Как видно по торчащим петлям, трехмерная структура хвоста, наблюдаемая в белке дикого типа на Фигуре 3А, нарушена, и белок должным образом не свернут. Это нарушение распространяется за пределы аминокислоты Q581, которая торчит в виде петли.

Фигура 4: Множественное выравнивание последовательностей белков WAP5.1 дикого типа арбуза (обозначенного как «wap5.1», SEQ ID NO: 1), дыни (SEQ ID NO: 3) и огурца (SEQ ID NO: 2). Изображенный белок арбуза представляет собой белок SEQ ID NO: 1. Белок арбуза WAP5.1 дикого типа с SEQ ID NO: 9 не отображен, но идентичен этому SEQ ID NO: 1, за исключением того, что в нем отличается аминокислота 51. Белки WAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 1 и SEQ ID

NO: 9 имеют 99,9% идентичности последовательности. Звездочка под каждой аминокислотой указывает на идентичные аминокислоты. Домен F-box, окруженный сплошной линией, на 100% идентичен белкам WAP5.1 арбуза, огурца и дыни. Домен LRR, обведенный пунктирной рамкой, также имеет высокую аминокислотную идентичность между белками WAP5.1 арбуза, огурца и дыни. N-концевая область, предшествующая домену F-box, является наименее консервативной среди трех рассматриваемых видов. Аминокислоты, выделенные жирным шрифтом, указывают позиции аминокислот, в которых мутантные аллели были получены в арбузе (либо отдельные аминокислотные замены, либо мутанты стоп-кодона), и которые могут быть получены в дыне и огурце.

Фиг. 5: Фотография срезанного плода арбуза, развивавшегося в отсутствие опыления на растении, гомозиготном по мутантному аллелю *wap5.1*, кодирующему белок, в котором аминокислота лейцин в положении 528 заменена аминокислотой фенилаланин (L528F).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Первый вариант осуществления настоящего изобретения касается культурных растений арбуза *Citrullus lanatus*, содержащих, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, придающего партенокарпию, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, в частности, факультативную партенокарпию. Таким образом, в одном аспекте предложены культивируемые растения арбуза, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля одного рецессивного гена, называемого WAP5.1.

Ген WAP5.1 является эндогенным геном культурного арбуза, который при мутации и в гомозиготной форме приводит к партенокарпии, в частности, факультативной.

Сегрегирующая популяция, полученная путем скрещивания мутантного растения арбуза партенокарпа, идентифицированного изобретателями, с элитной линией арбуза, позволила картировать ген WAP5.1 в области на хромосоме 5. Дальнейший анализ в двух картирующих популяциях привел к идентификации гена, содержащего мутацию, которая привела к замене одной аминокислоты (L528F) в кодируемом белке. Мутация была уникальной для этой линии и не была обнаружена в 93 линиях, подвергнутых повторному секвенированию всего

генома. Ген был назван WAP5.1 (от гена партенокарпии арбуза на хромосоме 5). Для скрининга растений на наличие мутантного аллеля был разработан специфический для аллеля маркер, приведенный в SEQ ID NO: 8.

В мутантном партенокарпическом растении арбуза лейцин в положении 528 белка WAP5.1 дикого типа (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9) был заменен на фенилаланин (L528F) в мутантном белке (показан на SEQ ID NO: 4 или в SEQ ID NO: 10), как показано на Фигуре 2. В кДНК мутантного аллеля (SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 12) нуклеотид 1582 представляет собой тимин (Т), тогда как в кДНК *wap5.1* дикого типа он представляет собой цитозин (С) (SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:11). Это изменение одного нуклеотида (или ОНП от С→Т) приводит к изменению кодона с СТТ (кодирующего лейцин, L) на ТТТ (кодирующего фенилаланин, F). В геномной ДНК SEQ ID NO: 7 (кодирующей аллель WAP5.1 дикого типа генома Чарльстон Грэй) мутация соответствует замене С в нуклеотиде 4123 на Т в нуклеотиде 4123, в результате чего кодон СТТ заменяется на ТТТ. В геномной ДНК SEQ ID NO: 14 (кодирующей аллель WAP5.1 дикого типа генома арбуза 97103) мутация соответствует замене С в нуклеотиде 4118 на Т в нуклеотиде 4118, что приводит к замене кодона СТТ на ТТТ.

Было обнаружено, что это единственное аминокислотное изменение в мутантном белке WAP5.1 привело к изменению нормального сворачивания белка домена LRR, в результате чего белок стал нефункциональным или имел пониженную функцию *in vivo*. В результате растение, гомозиготное по этому мутантному белку (и, следовательно, лишенное функционального белка дикого типа), дает бессемянные плоды в отсутствие опыления и плоды с нормальными семенами при опылении.

Были созданы другие мутанты по аллелю WAP5.1, а также идентифицированы ортологи огурца и дыни. Таким образом, полученные данные позволяют получать не только факультативные партенокарпические растения арбуза, но и факультативные партенокарпические растения огурца или дыни.

В одном аспекте предложено растение или часть растения арбуза, огурца или дыни, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, названного WAP5.1, причем указанный мутантный аллель либо

a) содержит одну или более мутаций в регуляторном элементе, приводящих к отсутствию экспрессии или снижению экспрессии аллеля, по сравнению с аллелем дикого типа, и/или

b) кодирует мутантный белок, содержащий замену, вставку или удаление одной или более аминокислот, по сравнению с белком дикого типа,

при этом указанный мутантный аллель по пунктам а) или б) придает факультативную партенокарпию, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, и причем аллель арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8 или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, аллель огурца дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 2 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, и аллель дыни дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 3 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3.

Функциональные белки WAP5.1 дикого типа арбуза, огурца и дыни представлены в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 9 (арбуз), SEQ ID NO: 2 (огурец) и SEQ ID NO: 3 (дыня). Они также изображены в множественном выравнивании последовательностей на Фигуре 4. Однако могут быть некоторые вариации аминокислотной последовательности у каждого вида, и функциональные белки WAP5.1 могут содержать, например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, которые отличаются от аминокислот в SEQ ID NO: 1, 2 и 3, представленные в настоящем документе, или при этом белок содержит, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% или 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с белки SEQ ID NO: 1, 2 или 3. Например, обнаружено различие между белком дикого типа в арбузе сорта Чарльстон Грэй и в элитной линии ТУ. Было обнаружено, что в элитной линии арбуза ТУ белок WAP5.1 дикого типа (SEQ ID NO: 9) отличается аминокислотой 51 от белка WAP5.1 дикого типа сорта Чарльстон Грэй (SEQ ID NO: 1). У линии ТУ в аминокислоте 51 имеется аргинин (R), в то время как в Чарльстон Грэй в аминокислоте 51 глицин (G). В кДНК линии ТУ кодон в нуклеотидах 151–153 SEQ ID NO: 11 представляет собой «CGT», в то время как в кДНК Чарльстон Грэй кодон представляет собой «GGT» в

нуклеотидах 151-153 SEQ ID NO: 6. Еще одно различие между аллелями состоит в том, что кодон для S450 отличается, а аминокислота (S450) идентична. В линии TY кодон в нуклеотидах с 1348 по 1350 SEQ ID NO: 11 представляет собой «AGC» (кодирует Ser, S), тогда как в аллеле Чарльстон Грэй кодон в нуклеотидах с 1348 по 1350 SEQ ID NO: 6 – это AGT» (кодирует Ser, S). Геномная ДНК аллелей дикого типа, очевидно, содержит те же самые различия в этих кодонах.

Так, например, в арбузе эталонный геном Чарльстон Грэй содержит ген, кодирующий белок SEQ ID NO: 1, тогда как эталонный геном сорта 97103 (геномная версия v2) и элитная линия TY содержат ген WAP5.1, имеющий 1 аминокислоту, которая отличается от SEQ ID NO: 1 (аминокислота 51), т.е. белок на 99,9% идентичен SEQ ID NO: 1 (при попарном выравнивании, таком как с использованием программы Needle из пакета Emboss). N-концевая последовательность перед доменом F-box менее консервативна, и это функциональные белки WAP5.1 (дикого типа). Следовательно, в одном аспекте функциональные варианты белка арбуза (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 9), белка огурца (SEQ ID NO: 2) и белка дыни (SEQ ID NO: 3) представляют собой белки, составляющие, по меньшей мере, 95% 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% или 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с белками SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3, при попарном выравнивании (например, с использованием программы Needle с параметрами по умолчанию).

В одном аспекте вариант аминокислотной последовательности предшествует домену F-box, то есть в аминокислотах с 1 по 236 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (арбуз), или в аминокислотах с 1 по 243 SEQ ID NO: 2 (огурец) или в аминокислотах с 1 по 246 SEQ ID NO: 3 (дыня). В другом аспекте функциональные белки, которые составляют, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% или 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с белками SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3, поэтому содержат аминокислоты, на 100% идентичные SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3 для области, начинающейся с аминокислоты 237 до конца SEQ ID NO: 1 или 9, или начинающейся с аминокислоты 244 до конца SEQ ID NO: 2, или начинающейся с аминокислоты 247 до конца SEQ ID NO: 3, поскольку эта разновидность предшествует домену F-box.

Поскольку домен F-box и домен LRR высококонсервативны как внутри вида, так и между видами, предполагается, что любые мутации в любом из этих

консервативных доменов приведут к появлению мутантного белка WAP5.1, имеющего пониженную функцию или не имеющего никакой функции *in vivo*, что приведет к факультативному партенокарпическому фенотипу, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, например, в диплоидном растении.

Как упоминалось ранее, домен F-box на 100% идентичен белкам WAP5.1 арбуза, огурца и дыни. F-box представляет собой домен, который обычно участвует в межбелковом взаимодействии, поэтому изменение последовательности домена F-box путем вставки, удаления или замены одной или более аминокислот в домене F-box отрицательно повлияет на функцию белка.

Следовательно, в одном из аспектов предложено растение или часть растения арбуза, огурца или дыни, содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, названного WAP5.1, при этом указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, встроенных, удаленных или замещенных в домене F-box белка, начиная с аминокислоты 237 и заканчивая аминокислотой 277 SEQ ID NO: 1 или 9 (арбуз), начиная с аминокислоты 244 и заканчивая аминокислотой 284 SEQ ID NO: 2 (огурец), начиная с аминокислоты 247 и заканчивая аминокислотой 287 SEQ ID NO: 3 (дыня), и при этом указанный мутантный аллель придает факультативную партенокарпию, когда он находится в гомозиготной форме,

и причем аллель арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или 9 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9, аллель огурца дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 2 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, и аллель дыни дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 3 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Как уже упоминалось выше, разновидность с, по меньшей мере, 95% 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% или 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности в функциональных белках дикого типа в одном аспекте находится в N-концевой части, предшествующей домену F-box, т.е. в области белка от аминокислоты от 1 до 236 SEQ ID NO: от 1 или 9 (арбуз), или в области

аминокислоты 1 до 243 SEQ ID NO: 2 (огурец), или в аминокислотах с 1 по 246 SEQ ID NO: 3 (дыня).

Термин «начинается в» и «заканчивается в» или «от» и «до» включает первую и последнюю упомянутые аминокислоты.

Домен LRR также высоко консервативен как внутри, так и между видами, как показано в Таблице ниже (идентификация последовательности с использованием попарного выравнивания доменов LRR с использованием программы Needle, параметры по умолчанию):

	Домен LRR арбуза (аминокислота 291-1033 SEQ ID NO: 1 или 9)	Домен LRR огурца (аминокислота 298-1040 SEQ ID NO: 2)	Домен LRR дыни (аминокислота 301-1040 SEQ ID NO: 3)
Домен LRR арбуза (аминокислота 291-1033 SEQ ID NO: 1 или 9)	100%		
Домен LRR огурца (аминокислота 298-1040 SEQ ID NO: 2)	96.2%	100%	
Домен LRR дыни (аминокислота 301-1040 SEQ ID NO: 3)	98.0%	97.8%	100%

Домен LRR представляет собой домен, который также обычно участвует во взаимодействии белок-белок, и, следовательно, изменение последовательности домена LRR путем вставки, удаления или замены одной или более аминокислот в домене LRR отрицательно повлияет на функцию белка. Домен LRR хорошо структурирован, что видно по «хвостовидной» структуре, в которую он сворачивается в белке WAP5.1 дикого типа арбуза, см. Фигуру 3А. Аминокислотные замены, делеции или вставки могут привести к неправильному сворачиванию домена LRR. Это можно проанализировать с помощью программы RaptorX Contact Prediction, как показано в Таблице 1 ниже и

на Фигуре 3В, где одна аминокислотная замена (L528F) приводит к нарушению или неправильному сворачиванию домена LRR (по сравнению с доменом LRR дикого типа), а появление этого мутантного аллеля приводит к факультативной партенокарпии, когда аллель находится в гомозиготной форме.

Следовательно, в одном из аспектов предложено растение или часть растения арбуза, огурца или дыни, содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, названного WAP5.1, при этом указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, встроенных, удаленных или замещенных в домене LRR белка, начиная с аминокислоты 291 и заканчивая аминокислотой 1033 SEQ ID NO: 1 или 9 (арбуз), начиная с аминокислоты 298 и заканчивая аминокислотой 1040 SEQ ID NO: 2 (огурец), начиная с аминокислоты 301 и заканчивая аминокислотой 1043 SEQ ID NO: 3 (дыня), предпочтительно, причем указанная вставка, делеция или замена приводит к неправильному сворачиванию домена LRR белка, и указанный мутантный аллель придает факультативную партенокарпию, когда он находится в гомозиготной форме,

и причем аллель арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или 9, или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9, аллель огурца дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 2 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, и аллель дыни дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 3 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Как уже упоминалось выше, разновидность с, по меньшей мере, 95% 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% или 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности в функциональных белках дикого типа в одном аспекте находится в N-концевой части, предшествующей домену F-box, т.е. в области белка от аминокислоты от 1 до 236 SEQ ID NO: от 1 или 9 (арбуз), или в области аминокислоты 1 до 243 SEQ ID NO: 2 (огурец), или в аминокислотах с 1 по 246 SEQ ID NO: 3 (дыня).

Неправильное сворачивание можно предсказать на основе данных RaptorX Contact Prediction, при этом трехмерная модель домена LRR или «хвоста» показывает, что сворачивание домена LRR мутантного белка отличается от хвостообразного сворачивания белка дикого типа, например, из хвоста торчат

петли или хвост укорочен, например, по меньшей мере, на 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или более С-концевых аминокислот, или хвост полностью отсутствует.

Таким образом, вставка, удаление и/или замена одной или более аминокислот в домене LRR может представлять собой вставку, удаление и/или замену, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и более аминокислот. Также в настоящем документе раскрывается удаление одной или более аминокислот посредством мутации кодона в стоп-кодон.

Мутантные аллели могут создаваться различными методами, такими как случайный мутагенез или целенаправленное редактирование генов, после чего можно проанализировать фенотип мутантного аллеля в растениях, гомозиготных по мутантному аллелю.

Любой мутантный аллель, который приводит к вставке, удалению и/или замещению одной или более аминокислот функционального белка дикого типа, может обеспечить наличие мутантного белка с пониженной функцией или с ее потерей и, таким образом, привести к проявлению фенотипа факультативной партенокарпии, если мутантный аллель находится в гомозиготной форме. В одном аспекте одна или более любых аминокислот, которые являются консервативными между белком WAP5.1 арбуза SEQ ID NO: 1 или 9, белком WAP5.1 огурца SEQ ID NO: 2 и белком WAP5.1 дыни SEQ ID NO: 3 (показан на Фигуре 4 с отметкой * под множественным выравниванием последовательностей) замещены другой аминокислотой или удалены, или кодон мутирован в стоп-кодон. Растения и части растений, содержащие такие мутантные аллели, представляют собой один вариант осуществления настоящего изобретения.

В настоящем документе в растениях арбуза (в элитной линии TY) было создано несколько мутантных аллелей, как показано в Таблице 1 выше. Эти мутантные аллели и растения арбуза, огурца или дыни, а также содержащие их части растения тоже представляют собой один аспект. Таким образом, в одном аспекте растение или часть растения содержит мутантный аллель гена WAP5.1, причем указанный мутантный аллель содержит мутацию в кодоне, кодирующем аминокислоту номер D209, A257, A266, W274, E287, Q333, L528, P308 или G330 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или белка, содержащего, по меньшей мере, 95%,

96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9) или кодирующем эквивалентную аминокислоту в SEQ ID NO: 2 или 3 (или белка, содержащего, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 или 3). Эти аминокислоты также являются консервативными трех видов, что видно на Фигуре 4, где они выделены жирным шрифтом. Мутация в кодоне в одном аспекте изменяет кодон для кодирования другой аминокислоты или стоп-кодона.

«Эквивалентную аминокислоту» можно легко определить путем выравнивания аминокислотной последовательности, см., например, Фигуру 4, где жирным шрифтом выделены эквивалентные аминокислоты огурца и дыни.

Мутация в кодоне может представлять собой вставку (по меньшей мере одного) нуклеотида, удаление или замена в кодоне, что приводит, например, к появлению другой рамки считывания или другого кодона, например, кодирующего другую аминокислоту или стоп-кодон. Также весь кодон может быть удален или замещен другим кодоном (или, при необходимости, стоп-кодоном), что приводит к удалению кодируемой аминокислоты или к ее замещению.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует замену аминокислоты или стоп-кодон аминокислоты с номером D209, A257, A266, W274, E287, Q333, L528, P308 или G330 SEQ ID NO: 1 или 9 (или белка, содержащего, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9) или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3 (или белка, содержащего, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 или 3).

В еще одном аспекте мутантный аллель кодирует одно или более из следующих изменений: D209V, A257V, A266V, W274STOP, E287K, Q333STOP, L528F, P308L и/или G330E SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или белка, содержащего, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9) или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3 (или белка, содержащего, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 или 3).

Как упоминалось ранее, растение, семя или часть растения арбуза, огурца или дыни может содержать мутантный аллель *wap5.1*, причем этот мутантный

аллель производится случайным или направленным мутагенезом, например, методами на основе CRISPR. Случайный мутагенез, например, может быть представлен химически индуцированным (например, обработка ЭМС), радиационно-индуцированным мутагенезом или другими методами, при которых мутации случайным образом индуцируются в геноме, а затем растения или части растений, содержащие мутации в эндогенном гене *wap5.1*, можно отследить и идентифицировать. Направленный мутагенез представляет собой способы, посредством которых мутации вводят конкретно в целевой ген, такой как ген *wap5.1*, с использованием, например, Crispr-Cas9 или Crispr-CpfI или других известных способов. Следует отметить, что с использованием таких способов мутантные аллели, описанные, например, в Таблице 1, могут быть получены без чрезмерной нагрузки, или же могут быть созданы другие мутантные аллели.

При упоминании в настоящем документе растения арбуза, огурца или дыни, такое упоминание в одном аспекте предусматривает семя, из которого может быть выращено растение, т.е. зародыш в семени может содержать, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *wap5.1* в соответствии с описанием.

В одном аспекте содержащее мутантный аллель растение не производится исключительно биологическим процессом. Это означает, что мутантный аллель в какой-то момент был создан в результате вмешательства человека. Если такой созданный человеком мутантный аллель передается от одного растения к другому путем скрещивания и селекции, то действие данного патента распространяется на растения, содержащие этот мутантный аллель, даже если само растение было получено исключительно путем скрещивания и селекции. Предпочтительно растение не является трансгенным, и, например, любой конструкт, используемый для модификации эндогенного гена, в случае целенаправленного редактирования гена, был удален из генома. Кроме того, растение предпочтительно не является трансгенным в том смысле, что мутантный аллель *wap5.1* не был введен извне и не был интегрирован где-либо в геном растения с использованием методов трансформации растений, а скорее мутантный аллель является эндогенным аллелем WAP5.1 дикого типа, который подвергся мутации (с использованием целенаправленного или случайного мутагенеза) в локусе генома, где расположен аллель дикого типа.

В одном аспекте растение арбуза, огурца или дыни является диплоидным и содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *wap5.1* в соответствии с описанием выше, т.е. растение является гетерозиготным. Поскольку фенотип наблюдается только в тех случаях, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, эти растения не являются факультативными партенокарпами, но дают нормальные плоды с семенами при опылении и не дают плодов при отсутствии опыления цветков. При самоопылении таких гетерозиготных растений получается гомозиготное растение, содержащее две копии мутантного аллеля. В другом аспекте растение арбуза, огурца или дыни является диплоидным и содержит две копии мутантного аллеля *wap5.1* в соответствии с описанием выше, т.е. растение является гомозиготным. Таким образом, растение также является факультативным партенокарпиом, который дает бессемянные плоды в отсутствие опыления и плоды с семенами при наличии опыления.

Растения и части растений, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *wap5.1*, предпочтительно представляют собой культивируемые, а не дикие растения. Поэтому предпочтительнее культурный арбуз (*Citrullus lanatus*), культурный огурец (*Cucumis sativus*) или культурная дыня (*Cucumis melo*). Растение может быть инбредной линией, гибридом F1 или линией скрещивания.

В одном аспекте растение представляет собой растение арбуза, которое является диплоидным, триплоидным или тетраплоидным, содержащим, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *wap5.1*. Диплоидное растение или часть растения в одном аспекте содержит две копии, триплоидное растение или часть растения содержит одну, две или три копии, а тетраплоидное растение или часть растения содержат две или четыре копии мутантного аллеля *wap5.1*.

Также в настоящем документе рассматриваются семена, из которых могут быть выращены растение или часть растения в соответствии с описанием выше.

Аналогичным образом, в документе рассматривается плод, производимый растением согласно описанию выше, при этом, при необходимости, плод является бессемянным и производится без опыления.

Растение или часть растения могут дополнительно содержать ген, придающий мужское бесплодие, или ген, придающий стеноспермокарпию, или другой ген, придающий партенокарпию.

Часть растения может быть представлена клеткой, цветком, листом, стеблем, черенком, семязачатком, пыльцой, корнем, корневищем, привоем, плодом, протопластом, зародышем или пыльником.

Также предлагается вегетативно размножаемое растение, полученное размножением из части растения и содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *wap5.1* в своем геноме.

В одном аспекте также предложен способ получения бессемянных плодов арбуза, включающий выращивание диплоидного растения арбуза, содержащего две копии мутантного аллеля *wap5.1* в соответствии с описанием, посредством чего предотвращается опыление цветков во время выращивания. Предотвратить опыление можно различными способами, например, удалением мужских цветков или мужских репродуктивных органов (тычинок, пыльцы), выращиванием в свободной от насекомых среде и/или мужской стерильностью растения.

В еще одном аспекте предложен способ получения бессемянных плодов арбуза, причем указанный способ включает выращивание триплоидного растения арбуза, содержащего одну, две или три копии мутантного аллеля *wap5.1* в соответствии с описанием, при этом растение-опылитель во время выращивания отсутствует.

Способ скрининга, обнаружения или генотипирования растений, семян, частей растений или ДНК из них на наличие мутантного аллеля гена, называемого WAP5.1, или отбора растения, семян или части растения, содержащих мутантный аллель гена, называемого WAP5.1, или для создания растения, семени или части растения, содержащих мутантный аллель гена, называемого WAP5.1, причем указанный мутантный аллель либо

- a) содержит одну или более мутаций в регуляторном элементе, приводящих к отсутствию экспрессии или снижению экспрессии аллеля, по сравнению с аллелем дикого типа, и/или
- b) кодирует мутантный белок, содержащий замену, вставку или удаление одной или более аминокислот, по сравнению с белком дикого типа,

причем аллель дыни дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или 9 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9, аллель огурца дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 2 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, и аллель дыни дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 3 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3.

В одном аспекте мутантный аллель *wap5.1* содержит мутацию в геномной ДНК, приводящую к экспрессии мутантного белка WAP5.1, содержащего одну или более вставленных, удаленных или замещенных аминокислот в соответствии с описанием выше, например, D209, A257, A266, E287, W274, Q333, L528, P308 или G330 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или эквивалентная аминокислота в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 9) или эквивалентная аминокислота в SEQ ID NO: 2 или 3 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 или 3).

Однако при этом различные мутантные аллели гена WAP5.1, вызывающие факультативную партенокарпию в гомозиготной форме, также являются вариантами осуществления изобретения. Такие различные мутантные аллели *wap5.1* без особых усилий могут быть получены специалистом в данной области. Квалифицированный специалист может, например, создать другие мутанты в гене WAP5.1 и определить, приводит ли их создание в равной степени к факультативной партенокарпии в гомозиготной форме у диплоидного растения арбуза, огурца или дыни.

После идентификации нуклеотидной последовательности гена специалист может получить растения арбуза, дыни или огурца, содержащие мутанты в гене WAP5.1, различными способами, например, мутагенезом, с применением TILLING или CRISPR-Cas или другими способами, известными специалистам. В частности, с помощью технологий направленной генной модификации, таких как Crispr-Cas, TALENS и других, специалист в данной области может осуществить целевые мутации. Затем он может подтвердить фенотип растения, гомозиготного по мутантному аллелю *wap5.1*, т.е. являющегося факультативным партенокарпом. Следовательно, специалист в данной области не ограничен

специфическими мутантами WAP5.1, которые были созданы изобретателями (и также могут быть получены специалистом в данной области техники), но в равной степени может генерировать и другие мутации в аллеле *wap5.1* арбуза, а также огурца и дыни, и таким образом сгенерировать другие мутанты, наличие которых приводит к факультативной партенокарпии в гомозиготной форме. Для получения необходимого фенотипа могут быть созданы и протестированы различные мутации, например, подвергнуты мутации могут быть регуляторные элементы, что позволит уменьшить (нокдаун) или устранить (нокаут) экспрессию аллеля и за счет этого уменьшить или устранить количество WAP5.1 белка, присутствующее в клетке или растении. В качестве альтернативы могут быть получены мутации, которые приводят к снижению или потере функции белка WAP5.1, т.е. мутации (такие как миссенс-мутации или мутации сдвига рамки считывания), которые приводят к замещению, вставке или удалению одной или более аминокислот, или посредством которых белок укорачивается путем введения стоп-кодона в кодирующую последовательность (несмысловые мутации). Поскольку белок WAP5.1 содержит два консервативных домена, «домен F-box» и «домен LRR», в одном аспекте подразумевается, что одна или более аминокислот замещены, удалены или вставлены в любой из этих доменов, поскольку такие мутации, вероятно, уменьшают функцию белка или приведут к ее потере. Затем можно проверить, приводит ли мутация к появлению ожидаемого фенотипа (факультативная партенокарпия), путем создания гомозиготных по мутации растений за счет самоопыления и выращивания линии растений с опылением цветов и без него, что позволит отследить, развиваются ли плоды факультативным партенокарпическим путем.

В качестве альтернативы специалист в данной области техники может реализовать способ получения факультативного партенокарпического культивируемого арбуза, огурца или дыни, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в (популяции) растения (растений) арбуза, огурца или дыни или семян, в частности, культурных растений, или предоставление (популяции) мутировавших растений или семян или их потомства;
- b) выбор растения, дающего бессемянные плоды без опыления женских цветков, а также плоды с семенами после опыления женских цветков;

- c) при необходимости, определение наличия в растении, выбранном в соответствии с пунктом b), мутантного аллеля гена WAP5.1; и
- d) при необходимости, выращивание растений, полученных на этапе c).

Этапы b) и c) также можно поменять местами, в результате чего на этапе b) выбирают растение, содержащее мутантный аллель гена WAP5.1, а на этапе c) определяют, дает ли растение (или его потомство, полученное путем самоопыления) бессемянные плоды без опыления женских цветков и плоды с семенами после их опыления.

Этап a) может проводиться, например, путем мутагенизации семян одной или более линий или разновидностей арбуза, огурца или дыни, например, путем обработки мутагенизирующими агентами, такими как химические мутагены, например, ЭМС (этилметансульфонат), или облучением УФ-излучением, рентгеновскими или гамма-лучами и т.п. Популяция может быть, например, популяцией TILLING. Предпочтительно популяцию мутантных растений подвергают самоопылению, по меньшей мере, один раз (например, для получения поколения M2 или M3, M4 и т.д.) перед проведением этапа b). На этапе b), относящемся к фенотипированию, растения предпочтительно выращивают в защищенной от насекомых среде, чтобы избежать присутствия насекомых-опылителей. Для выявления мутантов, дающих бессемянные плоды без опыления женских цветков, можно проводить регулярный визуальный осмотр женских цветков, завязывание плодов этих цветков без опыления и визуальный осмотр зрелых плодов (например, наличие жизнеспособных семян или бессемянных растений). Такие растения или их самоопыляющееся потомство можно проверить на наличие мутантного гена WAP5.1 путем опыления женских цветков, что позволит увидеть, засеяны ли плоды после опыления, генотипирования растений на наличие мутаций в гене WAP5.1 и кодируемом белке или же экспрессии гена WAP5.1, секвенирования, а также с применением других способов, известных специалистам в данной области. Таким образом, существуют различные способы или комбинации способов для проверки наличия мутантного аллеля гена WAP5.1 в фенотипически отобранном растении.

Если этап b) представляет собой отбор растений, содержащих мутантный аллель гена WAP5.1, специалист в данной области также может использовать различные способы обнаружения ДНК, мРНК или белка гена WAP5.1, чтобы

идентифицировать растение, содержащее мутантный аллель *wap5.1*. Геномная ДНК гена *wap5.1* арбуза дикого типа, кодирующего функциональный белок WAP5.1 (SEQ ID NO: 1), представляет собой ДНК SEQ ID NO: 7, а кДНК (мРНК), кодирующая белок SEQ ID NO: 1 представлена в SEQ ID NO: 6. Геномная ДНК гена *wap5.1* арбуза дикого типа, кодирующего функциональный белок WAP5.1 (SEQ ID NO: 9), представляет собой ДНК SEQ ID NO: 14 и кДНК (мРНК), кодирующую белок SEQ ID NO: 11. Промотор находится выше этой последовательности и может быть извлечен, например, путем секвенирования или из базы данных геномов арбуза. Аналогично, последовательности промоторов генов WAP5.1 огурца или дыни может легко извлечь специалист в данной области. Поскольку геномные последовательности, кодирующие определенный белок, могут незначительно различаться (например, из-за вырождения генетического кода или из-за изменчивости последовательностей интронов), геномные аллели, кодирующие белок WAP5.1 дикого типа, могут составлять не менее 90%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7 и/или с SEQ ID NO: 14.

В одном аспекте мутантный аллель гена WAP5.1 представляет собой мутантный аллель, наличие которого приводит к пониженной экспрессии или отсутствию экспрессии гена WAP5.1, или представляет собой мутантный аллель, приводящий к замещению, вставке или удалению одной или более аминокислот кодируемого белка WAP5.1, по сравнению с белком WAP5.1 дикого типа.

В одном аспекте мутантный аллель гена WAP5.1 можно получить путем индукции направленных или случайных мутаций в ген (промотор или другие регуляторные элементы, сайты сплайсинга, кодирующую область и т.д.) и отбора растений, например, из потомства, содержащего мутантный аллель *wap5.1*. В одном аспекте выбирается аллель, содержащий мутацию в кодоне, в частности, в кодоне домена F-box или домена LRR, например, мутацию, которая вызывает замену аминокислоты, сдвиг рамки считывания или появление стоп-кодона. В одном аспекте мутантный аллель вызывает показанные в Таблице 1 изменения в гене WAP5.1 арбуза или эквивалентное изменение в гене WAP5.1 огурца или дыни.

В одном аспекте маркер ОНП тимин (Т) в нуклеотиде 61 SEQ ID NO: 8 (маркер mWM23348429) обнаружен в геноме растения арбуза, дыни или огурца или его части, или ДНК из них.

Этот маркер ОНП выявляет аллель, содержащий мутацию L528F в арбузе, или соответствующее аминокислотное изменение в аллеле огурца или дыни *wap5.1*. Следует отметить, что геномная область, содержащая тимин, может быть, по меньшей мере, на 92%, 93%, 94%, 95%, 96% или 97% идентичной последовательности SEQ ID NO: 8, поскольку в ней есть два нуклеотида «У», относящиеся к нуклеотиду, представленному пиримидином (С или Т), и могут быть другие неидентичные нуклеотиды в геномной последовательности, фланкирующие ОНП в нуклеотиде 61 SEQ ID NO: 8. Blast SEQ ID NO: 8 против генома арбуза Чарльстон Грея, например, показывает, что SEQ ID NO: 8 на 97,52% идентичен эталонному геному сорта Чарльстон Грэй, который лишен мутации и содержит С (цитозин) в нуклеотиде 61 геномной последовательности.

Для других мутантных аллелей *wap5.1* можно легко разработать аналогичные маркеры ОНП (или другие маркеры) и анализы генотипирования ОНП (или другого генотипирования). Таким образом, настоящим документом охвачены аллель-специфические маркеры и методы обнаружения, в частности, для любого мутантного аллеля, наличие которого приводит к аминокислотной вставке, удалению или замещению в домене F-box или LRR белка WAP5.1 арбуза, огурца или дыни.

В частности, в одном аспекте генотип маркера mWM23348429 можно определить и использовать для отбора растений или растений-потомков, содержащих тимин в нуклеотиде 61 SEQ ID NO: 8 и, таким образом, содержащих мутантный аллель *wap5.1*, в котором аминокислота L528 SEQ ID NO: 1 или 9 (или соответствующая аминокислота последовательности, содержащей не менее 95% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 9) замещена на F (фенилаланин), или в которой соответствующая L (лейцин) в дыне или огурце замещена на F (фенилаланин), причем соответствующая аминокислота представляет собой L535 в огурце SEQ ID NO: 2 (или соответствующую аминокислоту последовательности, включающей, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2) и L538 в дыне SEQ ID NO: 3 или соответствующей аминокислотной последовательности, содержащей не менее 95% идентичности с SEQ ID NO: 3).

Диплоидное растение, гетерозиготное по *wap5.1* (т.е. *wap5.1/WAP5.1*), будет гетерозиготным по маркеру ОНП, например, будет иметь генотип 'ТС' по нуклеотиду 61 SEQ ID NO: 8 (т.е. растение содержит одну хромосому, имеющую Тимин, Т, в нуклеотиде 61 SEQ ID NO: 8 или в нуклеотиде 61 последовательности, содержащей, по меньшей мере, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, и вторую хромосому, содержащую цитозин С в нуклеотиде 61 SEQ ID NO: 8 или в нуклеотиде 61 последовательности, содержащей, по меньшей мере, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, в то время как растение, гомозиготное по *wap5.1* (т. е. *wap5.1/wap5.1*), будет иметь генотип «ТТ» для нуклеотида 61 SEQ ID NO: 8 (т.е. растение содержит две хромосомы, обе из которых содержат тимин, Т, в нуклеотиде 61, SEQ ID NO: 8 или в нуклеотиде 61 последовательности, содержащей, по меньшей мере, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO:8).

Маркер mWM23348429 был разработан на основе индуцированной мутации нуклеотида 4123 (цитозин) в геномной ДНК гена *WAP5.1* дикого типа SEQ ID NO: 7 в тимин (C4123 →Т), в результате чего кодон СТТ (кодирующий лейцин) замещается на кодон ТТТ, кодирующий фенилаланин, что приводит к замене L528P в белке WAP5.1 арбуза. Таким образом, нуклеотид 4123 геномной последовательности WAP5.1 SEQ ID NO: 7 соответствует нуклеотиду 61 маркера mWM23348429 SEQ ID NO: 8.

Аналогичным образом в геномной ДНК SEQ ID NO: 14 маркер mWM23348429 содержит ОНП для мутации в нуклеотиде 4118 (цитозин) в геномной ДНК гена *WAP5.1* дикого типа SEQ ID NO: 14 в тимин (C4118 →Т), в результате чего кодон СТТ (кодирующий лейцин) замещается на кодон ТТТ, кодирующий фенилаланин, что приводит к замене L528P в белке WAP5.1 арбуза.

Специфичные для мутантных аллелей маркеры и анализы маркеров можно одинаково легко разработать для любого мутантного аллеля *wap5.1*, поскольку базовое геномное изменение, например, в кодоне, может использоваться для разработки маркерного анализа с целью обнаружения геномного изменения, например, лежащих в основе аминокислотных изменений, указанных в Таблице 1, или других геномных изменений в мутантном аллеле *wap5.1*, по сравнению с аллелем *WAP5.1* дикого типа.

Используя такие аллель-специфические маркеры, которые выявляют специфические мутантные аллели *wap5.1*, можно проводить генотипирование для обнаружения присутствия и количества копий аллеля в растениях и растительном материале (или полученной из них ДНК). Таким образом, у диплоидов маркерным генотипом для вышеуказанного мутантного аллеля *wap5.1* (лежащего в основе изменений белка L528F в арбузе или соответствующего изменения в огурце или дыне) является ‘ТТ’, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме. У триплоидов или тетраплоидов маркерный генотип можно использовать для определения числа копий мутантного аллеля. Таким образом, генотип может быть, например, ТТТ, если в триплоиде присутствуют три копии, или ТТТТ, если в тетраплоиде присутствуют четыре копии, или ТТС, если в триплоиде присутствуют две копии, и т.д.

Растения и части растений

В одном варианте осуществления предлагается культурный арбуз, огурец или дыни или его часть (такая как клетка, ткань, орган, плод и т.д.), содержащая, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, называемого WAP5.1, причем указанный мутантный аллель передает факультативную партенокарпию, если он находится в гомозиготной форме.

В одном аспекте мутантный аллель представляет собой мутантный аллель гена арбуза, который кодирует белок WAP5.1 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9 (функциональный белок дикого типа), или представляет собой мутантный аллель гена огурца, который кодирует белок WAP5.1 SEQ ID NO: 2 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 (функциональный белок дикого типа), или является мутантным аллелем гена дыни, который кодирует белок WAP5.1 SEQ ID NO: 3, или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 (функциональный белок дикого типа), при этом мутантный аллель имеет пониженную экспрессию или не экспрессируется, или при этом мутантный аллель кодирует мутантный белок WAP5.1, содержащий одну или более аминокислот, замещенных, вставленных или удаленных, по сравнению с белком дикого типа.

В одном варианте осуществления одно или более аминокислотных замещений, вставок или удалений включают или состоят из замены, вставки или удаления одной или более аминокислот в одном или обоих консервативных доменов, т.е. в домене F-box и LRR. Мутантный белок имеет пониженную функцию или утратил функции, по сравнению с белком дикого типа (и, таким образом, по сравнению с растением дикого типа, содержащим ген WAP5.1 дикого типа), при этом предпочтительно клетка растения или растение, содержащее мутантный аллель в гомозиготной форме является факультативно партенокарпическим.

При упоминании в данном документе конкретного положения нуклеотида или аминокислоты, например, в положении аминокислоты 528 SEQ ID NO: 1 или 9, «или в положении аминокислоты 528 последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 %, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO» (или «в эквивалентном положении в последовательности, составляющей, по меньшей мере, 95% ...»), это означает, что нуклеотид или аминокислота присутствует в вариантной последовательности на месте нуклеотида или аминокислоты, соответствующем тому же нуклеотиду или аминокислоте (например, соответствующем аминокислоте 528 SEQ ID NO: 1 или 9) в вариантной последовательности, т.е. в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с указанной SEQ ID NO. Например, вариантная последовательность может быть на один или более нуклеотидов или аминокислот короче, но, если попарно совместить вариантную последовательность с указанной SEQ ID NO, можно увидеть, какой нуклеотид или аминокислота вариантной последовательности соответствует тому же нуклеотиду или аминокислоте. В вариантной последовательности это может быть, например, аминокислота 527 или 529 той вариантной последовательности, которая соответствует аминокислоте 528 указанной последовательности.

Мутантный аллель представляет собой мутацию в эндогенном гене культурного арбуза, огурца и дыни. Существование гена, придающего факультативную партенокарпию, позволяет специалисту в данной области создавать в этом гене другие мутанты *de novo*, например, в любой культивируемой линии или разновидности.

Квалифицированный специалист может без особых усилий получить растения согласно изобретению, например, путем реализации способа получения и/или идентификации мутантов WAP5.1 в мутантной популяции или путем целенаправленного редактирования гена WAP5.1.

Как упоминалось ранее, поскольку было установлено, что ген WAP5.1 представляет собой ген, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 или 9 (белок арбуза дикого типа) в нормальных, непартенокарпических растениях арбуза, мутанты, отличные от тех, которые создаются изобретателями (например, кодирующих мутантный белок SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10 или другие мутантные белки, упомянутые в Таблице 1 выше), могут создаваться *de novo*. Это же справедливо и для огурца и дыни, и по ним также могут быть получены любые мутанты *de novo*.

Поскольку естественные вариации могут существовать в функциональных белках WAP5.1 дикого типа, белок WAP5.1 дикого типа не обязательно должен быть на 100% идентичен белку SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3, но может иметь меньшую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3, например, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% или 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% при попарном выравнивании по всей длине до SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3. Однако при этом в одном аспекте консервативный домен F-box на 100% идентичен этому SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3, и поэтому данная разновидность, имеющая, по меньшей мере, 95% идентичности находится за пределами домена F-box. В другом аспекте консервативный домен LRR на 100% идентичен этой SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3, и поэтому данная разновидность, имеющая, по меньшей мере, 95% идентичности, находится за пределами домена LRR. В еще одном аспекте разновидность, имеющая, по меньшей мере, 95% идентичности, находится за пределами домена F-box и домена LRR. В другом аспекте разновидность, имеющая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности, в функциональных белках дикого типа SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3 находится в N-концевой части, предшествующей домену F-бокс, т.е. в области белка от аминокислоты 1 до 236 SEQ ID NO: 1 или 9 (арбуз), или в области аминокислот от 1 до 243 SEQ ID NO: 2 (огурец), или в аминокислотах от 1 до 246 SEQ ID NO: 3 (дыня).

Как уже упоминалось ранее, мутантный аллель гена, кодирующего белок WAP5.1, обеспечивает, чтобы растение давало бессемянные плоды в отсутствие

опыления и плоды с семенами при наличии опыления, если растение является гомозиготным по мутантному аллелю, в частности, диплоидное растение, гомозиготное по мутантному аллелю, и, при необходимости, триплоидное растение, содержащее, по меньшей мере, одну, две или три копии мутантного аллеля, или тетраплоидное растение, содержащее, по меньшей мере, две или четыре копии мутантного аллеля. Что касается вариантов осуществления изобретения, мутация в мутантном аллеле гена, кодирующего белок WAP5.1, может представлять собой любую мутацию, включая удаления, укорочения, вставки, точечные мутации, бессмысловые мутации, миссенс-мутации или несинонимичные мутации, мутации сайта сплайсинга, мутации со сдвигом рамки считывания и/или мутации в регуляторных последовательностях. В одном аспекте мутация в мутантном аллеле гена, кодирующего белок WAP5.1, представляет собой точечную мутацию. Мутация может происходить в последовательности ДНК, содержащей кодирующую последовательность гена, кодирующего белок WAP5.1, или в последовательности РНК, кодирующей белок WAP5.1, или может происходить в аминокислоте белка WAP5.1. Что касается последовательности ДНК гена, кодирующего белок WAP5.1, мутация может происходить в кодирующей последовательности или в некодирующих последовательностях, таких как 5'- и 3'-нетранслируемые области, промоторы, энхансеры и т.д. кодирующего белок гена WAP5.1. Что касается РНК, кодирующей белок WAP5.1, мутация может происходить в пре-мРНК или в мРНК. В одном аспекте наличие мутантного аллеля приводит к потере или снижению функции белка из-за замены, вставки и/или удаления одной или более аминокислот, например, в результате замены, вставки или удаления одной или более аминокислот в консервативном домене F-box или в домене LRR. Например, усечение белка, вызывающее удаление одного или обоих этих доменов, или части любого из этих доменов, приведет к потере или понижению функции белка. Таким образом, мутации стоп-кодона, например, в N-концевой части, предшествующей домену F-box (аминокислоты от 1 до 236 SEQ ID NO: 1 или 9 или последовательность, включающая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9; аминокислоты от 1 до 243 SEQ ID NO: 2 или последовательность, включающая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2; аминокислоты от 1 до 246 SEQ ID NO: 3, или последовательность, включающая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3), или в одном из

консервативных доменов приводит к появлению укороченных белков с пониженной функцией или с потерей функции.

Аналогичным образом, аминокислотные вставки, удаления или замены в N-концевой части, предшествующей домену F-box или одному из консервативных доменов, то есть домену F-box или домену LRR, могут привести к появлению белка, имеющего пониженную или утраченную функцию.

В одном аспекте любая вставка, удаление и/или замещение аминокислоты, которые приводят к девиантному/неправильному 3-мерному сворачиванию белка согласно прогнозу по результатам анализа RaptorX Contact Prediction, может привести к снижению функции *in vivo* или к отсутствию функции мутантного белка WAP5.1.

Любой мутантный аллель можно проанализировать на предмет фенотипа, если он находится в гомозиготной форме, например, у диплоидных растений, чтобы увидеть, действительно ли растение становится факультативным партенокарпом.

Таким образом, один вариант осуществления изобретения относится к растительным клеткам или растениям согласно изобретению, содержащим мутантный аллель гена, кодирующего белок WAP5.1, причем мутантный аллель содержит или влияет на одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из следующего

- a) удаление, мутация с усечением, вставка, точечная мутация, нонсенс-мутация, миссенс-мутация или несинонимичная мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация со сдвигом рамки в геномной последовательности;
- b) мутация в одной или более регуляторных последовательностях;
- c) удаление, мутация с усечением, вставка, точечная мутация, внесмысловая мутация, миссенс-мутация или несинонимичная мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация со сдвигом рамки в кодирующей последовательности;
- d) удаление, мутация с усечением, вставка, точечная мутация, нонсенс-мутация, миссенс-мутация или несинонимичная мутацию, мутацию

сайта сплайсинга, мутацию со сдвигом рамки в пре-мРНК или мРНК;
и/или

- е) удаление, укорочение, вставка или замена одной или более аминокислот в белке WAP5.1.

В одном аспекте наличие мутантного аллеля приводит к пониженной экспрессии или к отсутствию экспрессии гена WAP5.1, или мутантный аллель кодирует белок с пониженной функцией или с ее потерей.

Пониженная экспрессия или отсутствие экспрессии указывает на наличие мутации в регуляторной области гена WAP5.1, такой как промотор, в результате чего образуется уменьшенный транскрипт мРНК или отсутствует транскрипт мРНК аллеля WAP5.1, по сравнению с растениями и растительными частями, содержащими аллель WAP5.1 дикого типа. Снижение экспрессии можно, например, определить путем измерения количества транскриптов мРНК, кодирующих белок WAP5.1, например, с помощью Нозерн-блоттинга или ОТ-ПЦР. Здесь понижение предпочтительно означает уменьшение количества РНК-транскриптов, по меньшей мере, на 50%, в частности, по меньшей мере, на 70%, при необходимости, по меньшей мере, на 85% или, по меньшей мере, на 95%, или даже на 100% (отсутствие экспрессии), по сравнению с растением или частью растения, содержащими ген WAP5.1 дикого типа. Экспрессию можно анализировать, например, в ткани молодого листа или ткани завязи.

В одном аспекте белок, содержащий одну или более аминокислот, замещен, вставлен или удален, по сравнению с белком дикого типа. Таким образом, для арбуза одна или более аминокислот вставлены, удалены или замещены, по сравнению с белком WAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 1 или 9, или белком WAP5.1 дикого типа, содержащим, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9; для огурца одна или более аминокислот вставлены, удалены или замещены, по сравнению с белком WAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 2 или 9, или белком WAP5.1 дикого типа, содержащим, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2; для дыни одна или более аминокислот вставлены, удалены или замещены, по сравнению с белком WAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 3, или белком WAP5.1 дикого типа, содержащим, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности

последовательности с SEQ ID NO: 3, при этом мутантный белок имеет пониженную функцию или утратил ее, по сравнению с белком дикого типа и следовательно это приводит к факультативной партенокарпии, если мутантный аллель присутствует в гомозиготной форме в диплоидном растении.

В одном аспекте белок WAP5.1 дикого типа содержит консервативный домен F-box. Таким образом, в одном аспекте мутантный аллель представляет собой мутантный аллель гена WAP5.1, ген которого кодирует белок дикого типа SEQ ID NO: 1 или 9 (арбуз) или SEQ ID NO: 2 (огурец) или SEQ ID NO: 3 (дыня), или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97% 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9, SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 3, и при этом белок дикого типа содержит консервативный домен F-box из аминокислот с 237 по 277 SEQ ID NO: 1 или 9.

В одном аспекте белок WAP5.1 дикого типа содержит консервативный домен LRR. Таким образом, в одном аспекте мутантный аллель представляет собой мутантный аллель гена WAP5.1, ген которого кодирует белок дикого типа SEQ ID NO: 1 или 9 (арбуз) или SEQ ID NO: 2 (огурец) или SEQ ID NO: 3 (дыня), или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97% 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9, SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 3, и при этом белок дикого типа арбуза содержит консервативный домен LRR аминокислот с 291 по 1033 SEQ ID NO: 1 или 9 (арбуз), белок дикого типа огурца содержит консервативный домен LRR аминокислот с 298 по 1040 SEQ ID NO: 2 (огурец), или белок дыни дикого типа содержит консервативный домен LRR аминокислот с 301 по 1043 SEQ ID NO: 3 (дыня).

В одном аспекте белок WAP5.1 дикого типа содержит консервативные домены F-боксы и LRR, т.е. любая разновидность функционального белка дикого типа находится на N-конце, предшествующем домену F-box. Таким образом, в одном аспекте мутантный аллель представляет собой мутантный аллель гена WAP5.1, ген которого кодирует белок дикого типа SEQ ID NO: 1 или 9 (арбуз) или SEQ ID NO: 2 (огурец) или SEQ ID NO: 3 (дыня), или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97% 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9, SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 3, и при этом белок дикого типа арбуза содержит аминокислоты от 237 до 1033 SEQ ID NO: 1 или 9 (арбуз), белок дикого типа огурца содержит аминокислоты с 244 по

1040 SEQ ID NO: 2 (огурец), или белок дыни дикого типа содержит аминокислоты с 247 по 1043 SEQ ID NO: 3 (дыня).

Мутантные аллели вышеуказанных аллелей дикого типа представляют собой в одном аспекте мутантные аллели со сниженной или отсутствующей экспрессией (в результате, например, мутаций в промоторных или энхансерных элементах) или продуцирующие мутантный белок, который содержит одну или более вставленных, делетированных или замененных аминокислот, по сравнению с белком дикого типа, в результате чего, например, сворачивание мутантного белка в трехмерную структуру отличается от сворачивания белка дикого типа, что можно проанализировать с помощью инструмента RaptorX Contact Prediction и/или мутантный белок имеет сниженную функцию или отсутствующую функцию *in vivo*, что можно определить, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме в растении, а также по результатам анализа того, плодоносит ли растение без опыления (партенокарпия), например, при выращивании в условиях отсутствия насекомых, а также плодоносят ли (женские) цветы, несмотря на отсутствие опыления. Кроме того, растения можно проверить на предмет получения нормальных плодов с семенами при опылении (женских) цветков. Если мутантный аллель является причиной факультативной партенокарпии *in vivo*, в то время как контрольное растение, которое содержит только аллели Wap5.1 дикого типа, не является факультативным партенокарпом, то мутантный белок имеет сниженную функцию или отсутствующую функцию, по сравнению с белком дикого типа. Такой же фенотипический анализ может выполняться для мутантного аллеля с пониженной или отсутствующей экспрессией гена. Таким образом, любой мутантный аллель можно сделать гомозиготным в растении, и фенотип можно сравнить с контрольным растением, содержащим исходный немутированный аллель.

Было установлено, что домен F-бокс идентичен у трех видов Cucurbitaceae – т.е. у арбуза, дыни и огурца, как показано на Фигуре 4. Он включает в себя последовательность

LTDDLHMFVFSFLDHINLCRAAIVCRQWQAASAHEDFWRCL (SEQ ID NO: 13), которая присутствует в CiWAP5.1 дикого типа, SEQ ID NO: 1 и 9, аминокислоты 237 – 277, а также в CsWAP5.1 дикого типа, SEQ ID NO: 2, аминокислоты 244 – 284, а также в CmWAP5.1 дикого типа, SEQ ID NO: 3, аминокислоты 247 – 287.

Вероятнее всего, F-бокс будет на 100% идентичен и в других функциональных вариантах WAP5.1 дикого типа, так как он высококонсервативен и необходим для правильного функционирования белка (вероятнее всего, в рамках межбелкового взаимодействия). Следовательно, мутация F-бокса путем вставки, удаления или замены одной или более его аминокислот снизит или отменит функцию белка WAP5.1 *in vivo*.

Таким образом, в одном аспекте растение по настоящему документу включает в себя мутантный аллель WAP5.1, который кодирует белок WAP5.1, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, делетированных или замененных в последовательности домена F-box LTDDLHLMVFSFLDHINLCRAAIVCRQWQAASAHEDFWRCL (SEQ ID NO: 13). Функциональный белок WAP5.1 дикого типа, который мутирован и содержит одну или более вставленных, замененных или делетированных аминокислот, выбирают из CIWAP5.1 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 9, CsWAP5.1 SEQ ID NO: 2 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 и CmWAP5.1 SEQ ID NO: 3 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 3, причем все белки дикого типа содержат домен F-бокса последовательности LTDDLHLMVFSFLDHINLCRAAIVCRQWQAASAHEDFWRCL (SEQ ID NO: 13).

В еще одном аспекте функциональный белок WAP5.1 дикого типа, который мутирован и содержит одну или более встроенных, замененных или делетированных аминокислот, выбран из CIWAP5.1 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 9, CsWAP5.1 SEQ ID NO: 2 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2, и CmWAP5.1 SEQ ID NO: 3 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 3, причем все белки дикого типа содержат домен F-бокс последовательности LTDDLHLMVFSFLDHINLCRAAIVCRQWQAASAHEDFWRCL (SEQ ID NO: 13) и при этом «по меньшей мере 95%» вариации последовательности обнаружены в N-концевой части белка, предшествующей домену F-бокс. Таким образом, область, начинающаяся от начала F-бокса до конца белка, в одном аспекте на 100% идентична по последовательности с SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3.

Мутантный белок, содержащий сдвиг рамки, приводящий к замене одной или более аминокислот в домене F-бокс, или мутантный белок, содержащий усечение, ведущее к делеции одной или более аминокислот домена F-бокс, рассматривается в рамках настоящего документа как мутантный белок со сниженной или отсутствующей функцией *in vivo*.

В арбузе были получены три специфических мутанта в домене F-бокс, как показано в Таблице 1 и на Фигуре 4. В одном аспекте растение арбуза, огурца или дыни, содержащее любой из трех указанных специфических мутантов в домене F-бокс белка ClWAP5.1, CsWAP5.1 или соответственно CmWAP5.1.

Таким образом, в одном аспекте предоставлен мутантный аллель ClWAP5.1, кодирующий мутантный белок, в котором A257 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичная SEQ ID NO:1 или 9), A266 SEQ ID NO: 1 или 9 (или последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичная SEQ ID NO: 1 или 9) и/или W274 SEQ ID NO: 1 или 9 (или последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичная SEQ ID NO: 1 или 9) замещен другой аминокислотой или делетирован.

Таким образом, еще одним аспектом предусмотрен мутантный аллель CsWAP5.1, кодирующий мутантный белок, в котором A264 SEQ ID NO: 2 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2), A273 SEQ ID NO: 2 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2) и/или W281 SEQ ID NO: 2 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2) замещен другой аминокислотой или делетирован.

Таким образом, еще одним аспектом предусмотрен мутантный аллель CmWAP5.1, кодирующий мутантный белок, в котором A267 SEQ ID NO: 3 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 3), A276 SEQ ID NO: 3 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 3) и/или W284 SEQ ID NO: 3 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 3) заменена другой аминокислотой или делетирована.

По тексту настоящего документа аминокислоты в диапазоне от одной аминокислоты до другой аминокислоты, включает в себя указанную начальную/первую и конечную/последнюю аминокислоты.

Было обнаружено, что LRR-домен является высококонсервативным между тремя видами Cucurbitaceae – т.е. арбузом, дыней и огурцом, как показано на Фигуре 4. LRR-домен на 96,2% идентичен между арбузом и огурцом, на 98% между арбузом и дыней и на 97,8% между огурцом и дыней (при попарном выравнивании с использованием программы Needle из пакета Emboss). Он также хорошо структурирован, так как складывается в своего рода «хвост», как это видно на Фигуре 3А.

LRR-домен присутствует в C1WAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 9, аминокислоты 291 – 1033, в CsWAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 2, аминокислоты 298 – 1040 и в CmWAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 3, аминокислоты 301 – 1043. Вероятнее всего, LRR-домен будет, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен LRR-домени SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3 в других функциональных вариантах WAP5.1 дикого типа, поскольку он является высококонсервативным и необходим для правильного сворачивания в трехмерную структуру и правильного функционирования белка (скорее всего, за счет межбелкового взаимодействия). Следовательно, мутация LRR-домена путем вставки, удаления или замены одной или более его аминокислот приведет к сворачиванию белка домена в другую трехмерную структуру и/или сократит функцию белка WAP5.1 *in vivo* либо приведет к ее отсутствию.

Таким образом, в одном аспекте предусмотренное настоящим документом растение содержит мутантный аллель WAP5.1, который кодирует белок WAP5.1, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, делетированных или замененных в LRR-домени SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3, или в LRR-домени, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен LRR-домени SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3.

Соответственно, в другом аспекте растение, предусмотренное настоящим документом, содержит мутантный аллель WAP5.1, который кодирует белок WAP5.1, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, делетированных или замененных в LRR-домени SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3, или в LRR-домени

варианта белка WAP5.1 дикого типа, где белок дикого типа, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности с SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3.

В одном аспекте функциональный белок WAP5.1 дикого типа, который мутирован и содержит одну или более аминокислот, вставленных, замененных или делетированных в LRR-домене, выбирают из CIWAP5.1 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 9, CsWAP5.1 SEQ ID NO: 2 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 и CmWAP5.1 SEQ ID NO: 3 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 3, вследствие чего все из белков дикого типа содержат LRR-домен, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен LRR-домену SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3.

В одном аспекте функциональный белок WAP5.1 дикого типа, который мутирован и содержит одну или более аминокислот, вставленных, замененных или делетированных в LRR-домене, выбирают из CIWAP5.1 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 9, CsWAP5.1 SEQ ID NO: 2 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 и CmWAP5.1 SEQ ID NO: 3 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 3, при этом вариация последовательности «по меньшей мере на 95%, 96% или более» обусловлена вариацией последовательности в N-концевой части белка, т.е. предшествующей домену F-бокс, в то время как оставшаяся часть белка (от начала домена F-бокс до конца белка) идентична последовательности SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3.

Мутантный белок, содержащий сдвиг рамки, приводящий к замене одной или более аминокислот в LRR-домене, или мутантный белок, содержащий усечение, ведущее к делеции одной или более аминокислот LRR-домена, рассматривается в рамках настоящего документа как мутантный белок со сниженной или отсутствующей функцией *in vivo*.

В случае с арбузом были получены три специфических мутанта в LRR-домене, как показано в Таблице 1 и на Фигуре 4. В одном аспекте растение арбуза, огурца или дыни содержит любой из четырех специфических мутантов в LRR-домене CIWAP5.1., белок CsWAP5.1 или соответственно CmWAP5.1.

Таким образом, в одном аспекте представлен мутантный аллель CIWAP5.1, кодирующий мутантный белок, в котором Q333 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 9) и/или L528 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 9) и/или P308 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 9), и/или G330 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 9) заменена другой аминокислотой или делетирована.

В одном аспекте представлен мутантный аллель CsWAP5.1, кодирующий мутантный белок, в котором Q340 SEQ ID NO: 2 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2) и/или L535 SEQ ID NO: 2 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2) и/или P315 SEQ ID NO: 2 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2), и/или G337 SEQ ID NO: 2 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 2), заменена другой аминокислотой или делетирована.

В одном аспекте представлен мутантный аллель CmWAP5.1, кодирующий мутантный белок, в котором Q343 SEQ ID NO: 3 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 3) и/или L538 SEQ ID NO: 3 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 3), и/или P318 SEQ ID NO: 3 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 3), и/или G340 SEQ ID NO: 3 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: 3), заменена другой аминокислотой или делетирована.

Отсылка на «делецию» аминокислоты включает в себя мутацию, при которой кодон заменяется на стоп-кодон, либо кодон подвергается делеции или мутации, при которой происходит сдвиг рамки, в результате чего аминокислота не кодируется. Точно так же ссылка на «замену» аминокислоты включает в себя мутацию, при которой кодон кодирует другую аминокислоту, либо происходит вставка кодона, или мутация, при которой происходит сдвиг рамки считывания, приводящий к кодированию другой аминокислоты.

Растения и части растений, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *war5.1*, могут быть растениями семейства Cucurbitaceae, в частности, культивируемыми видами, такими как огурец (*Cucumis sativus*), дыня (*Cucumis melo*) и арбуз (*Citrullus lanatus*). Также сюда относятся растения и части растений семейства Cucurbitaceae, в частности, огурец, дыня и арбуз, содержащие две копии мутантного аллеля *war5.1*, при этом диплоидные растения, содержащие две копии мутантного аллеля *war5.1*, приводят к появлению растений, демонстрирующих фенотип факультативной партенокарпии.

В одном аспекте мутантный аллель *war5.1* является гетерозиготным в диплоидной растительной клетке или растении, например, в диплоидном арбузе, огурце или дыне. В другом аспекте мутантный аллель *war5.1* является гомозиготным в диплоидной растительной клетке или растении.

Растительные клетки и растения предпочтительно представляют собой культивируемые растения, такие как элитные селекционные линии или сорта, а не дикие растения. Огурец может быть любым типом огурца, таким как длинный огурец, огурец для засола, салатный огурец и т.д. Аналогично дыня может быть любым типом дыни (галия, пьель-де-сапо, мускусная дыня, белая мускатная дыня и т.д.), а арбуз может быть любым типом арбуза.

Растения арбуза и их части, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *war5.1*, могут быть диплоидными, тетраплоидными или триплоидными. В другом аспекте это может быть другой полиплоид, например, пентаплоид, гексаплоид, гептаплоид, октаплоид и т.д. Тетраплоидное растение, содержащее четыре копии *war5.1*, можно использовать, например, для получения октаплоида путем удвоения хромосом. Скрещивание такого октаплоида с диплоидом, гомозиготным по аллелю *war5.1*, дает пентаплоид, состоящий из пяти копий аллеля *war5.1*. В одном аспекте полиплоидный арбуз содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *war5.1*, но также может содержать большее количество копий, например, в предпочтительном аспекте триплоидное растение содержит две или три копии мутантного аллеля *war5.1*, а тетраплоид содержит две или четыре копии мутантного аллеля *war5.1*.

Таким образом, диплоидное растение может иметь генотип *war5.1/WAP5.1* (гетерозиготный по мутантному аллелю) или *war5.1/war5.1* (гомозиготный по

мутантному аллелю). В одном аспекте диплоидное растение, содержащее аллель $wap5.1$ в гомозиготной форме, представляет собой двойное гаплоидное растение (ДГ), например, двойное гаплоидное растение арбуза, огурца или дыни, или растительную клетку, или часть растения. Растения ДГ можно получить путем удвоения хромосом (например, за счет обработки колхицином) гаплоидных клеток.

Триплоидное растение арбуза может иметь генотип $wap5.1/WAP5.1/WAP5.1$ или $wap5.1/wap5.1/wap5.1$ или $wap5.1/wap5.1/wap5.1$. Триплоидное растение с генотипом $wap5.1/WAP5.1/WAP5.1$ может быть получено путем скрещивания тетраплоидного женского растения дикого типа ($WAP5.1/WAP5.1/WAP5.1/WAP5.1$) с диплоидным мужским растением, которое является гомозиготным по мутантному аллелю ($wap5.1/wap5.1$). Триплоидное растение с генотипом $wap5.1/wap5.1/WAP5.1$ может быть получено путем скрещивания тетраплоидного женского растения ($wap5.1/wap5.1/wap5.1/wap5.1$) с диплоидным мужским растением, которое является гомозиготным по аллелю дикого типа ($WAP5.1/WAP5.1$).

Тетраплоидное растение арбуза может иметь генотип $wap5.1/WAP5.1/WAP5.1/WAP5.1$ или $wap5.1/wap5.1/wap5.1/WAP5.1$, или $wap5.1/wap5.1/wap5.1/wap5.1$, или $wap5.1/wap5.1/wap5.1/wap5.1$. Генотипы $wap5.1/wap5.1/wap5.1/WAP5.1$ можно получить путем удвоения хромосом диплоида $wap5.1/WAP5.1$. Генотипы $wap5.1/wap5.1/wap5.1/wap5.1$ можно получить путем удвоения хромосом диплоида $wap5.1/wap5.1$. Два других генотипа – $wap5.1/WAP5.1/WAP5.1/WAP5.1$ и $wap5.1/wap5.1/wap5.1/wap5.1$ – можно, например, получить путем скрещивания двух тетраплоидов генотипа $wap5.1/wap5.1/wap5.1/WAP5.1$ и определения генотипов в рамках потомства.

В одном аспекте растение арбуза гомозиготно по аллелю $wap5.1$, в другом аспекте оно гетерозиготно по $wap5.1$. В одном аспекте это инбредная линия или разновидность. В другом аспекте это гибрид F1.

Настоящая заявка распространяется и на семена, из которых может быть выращено любое из указанных растений арбуза, огурца или дыни, равно как и части такого растения, такие как плоды без косточек, полученные в отсутствие опыления, цветы, клетки, корни, подвои, черенки, листья, стебли, способы вегетативного размножения, черенки, размножение семенами (например, самоопылением), а

также настоящая заявка распространяется на клеточные или тканевые культуры *in vitro*, а также пыльца, завязи и т.д.

Диплоидные растения арбуза, огурца и дыни, содержащие мутант аллеля *war5.1*

В одном аспекте растение арбуза, огурца или дыни представляет собой диплоидную линию (например, инбредную линию) или сорт, имеющий, по меньшей мере, одну мутантную копию аллеля *war5.1*, предпочтительно две мутантные копии (т.е. гомозиготные по аллелю *war5.1*). При предотвращении опыления женских цветков диплоидное растение, гомозиготное по аллелю *war5.1*, даст плоды без семян. Когда опыление произойдет, плоды будут с семенами.

Во избежание опыления, можно, например, выращивать растение в условиях отсутствия насекомых. При этом также можно получить диплоидное растение, для которого характерна мужская стерильность. Таким образом, одним аспектом изобретения предусмотрено диплоидное растение, гомозиготное по аллелю *war5.1*, для которого характерна мужская стерильность. Мужская стерильность – это неспособность растений производить функциональные пыльники, пыльцу или мужские гаметы. У арбуза идентифицировано несколько генов мужской стерильности, в том числе ген *ms-1*. Ядерный ген *ms-1* отвечает за мужскую стерильность, при этом у растений с геном *ms-1*, который представлен в гомозиготной форме (*ms-1* является рецессивным), нормальное развитие пыльников затруднено, тогда как развитие женских цветков нормальное. Наличие гена приводит к отсутствию выработки пыльцы. Маркеры для гена *ms-1* и растения, содержащие указанный ген, описаны в заявке EP 2959771, при этом в онлайн базе патентных данных и их доступности PINTO упоминается, что сорт Bonta или Bonta F1 Seminis являются растением согласно настоящему патенту. Ген *ms-1* также был описан в работе Жанга и др., 1996 г. (*HortScience* 31(1): 123-126). Ген *ms-1* находится на хромосоме 6 арбуза и поэтому может легко комбинироваться с аллелем *war5.1* на хромосоме 5. В дыне также присутствуют гены мужской стерильности. В случае с огурцом мутантный аллель *war5.1* может сочетаться с гиноциозностью, т.е. образованием женских, пестичных цветков.

Таким образом, в одном аспекте диплоидное растение и часть растения согласно изобретению обладают мужской стерильностью и/или содержат ген

мужской стерильности. Если ген мужской стерильности является рецессивным геном, растение и часть растения предпочтительно содержат ген в гомозиготной форме. В одном аспекте растение арбуза включает в себя ген *ms-1*, предпочтительно в гомозиготной форме. Таким образом, в одном аспекте диплоидное растение арбуза имеет на хромосоме 5 мутантный ген *war5.1* в гомозиготной форме (*war5.1/war5.1*), а также дополнительно содержит ген мужской стерильности, например, *ms-1* в гомозиготной форме, т.е. если ген мужской стерильности является рецессивным (например, *ms-1/ms-1*) или, при необходимости, представлен в гетерозиготной форме, если мужская стерильность является доминантной. Одним предпочтительным растением является диплоидное растение, гомозиготное по *war5.1* и гомозиготное по *ms-1*.

Еще одним способом сделать так, чтобы растения по изобретению, в частности, диплоидные растения арбуза, во всех случаях давали бессемянные плоды (а не только при отсутствии опыления), является сочетание гена *war5.1* в гомозиготной форме с геном, обеспечивающим стеноспермокарпию, поскольку в этом случае, если опыление и произойдет, плоды, несмотря на опыление, будут бессемянными. В одном аспекте ген стеноспермокарпии представляет собой рецессивный ген, известный как *emb1*. Ген *Emb1* дикого типа и мутантный ген были описаны в одновременно находящейся на рассмотрении заявке EP16171462.1. Ген *Emb1* кодирует SDS-подобный белок циклин. Когда мутантный аллель *emb1* находится в гомозиготной форме, возникает стеноспермокарпия. «Стеноспермокарпия» означает, что для завязывания и развития плодов требуется опыление, но при этом отсутствуют плоды, дающие зрелые или жизнеспособные семена. Зрелые или жизнеспособные семена не развиваются у стеноспермокарпических растений из-за задержанного развития семян или деградации семязачатков и/или зародышей и/или эндосперма или недоразвития семязачек и/или зародышей и/или эндосперма до достижения зрелости. Таким образом, когда диплоидные растения, которые гомозиготны по мутантному аллелю *emb1* (*emb1/эмб1*), самоопыляются или опыляются пыльцой другого растения, они дают бессемянные диплоидные плоды.

Таким образом, в одном аспекте диплоидное растение арбуза содержит на хромосоме 5 ген *war5.1* в гомозиготной форме (*war5.1/war5.1*) и дополнительно содержит ген стеноспермокарпии, например, *emb1* в гомозиготной форме,

например, если ген стеноспермокарпии является рецессивным (например, *emb1/emb1*) или, при необходимости, представлен в гетерозиготной форме, если ген стеноспермокарпии является доминантным. Предпочтительным растением является диплоидное растение, гомозиготное по *war5.1* и гомозиготное по *emb1*.

Один мутантный аллель *emb1* может быть получен из семян арбуза, являющихся гетерозиготными или гомозиготными по мутантному аллелю гена, кодирующего SDS-подобный белок циклина (также именуемый ген *Emb1*), депонированный Nunhems B.V. под номером NCIMB 42532. Из указанных семян 25% содержат мутантный аллель (см. мРНК SEQ ID NO:27), который кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 28. Аллель дикого типа гена *Emb1* может быть получен из семян арбуза, являющихся гетерозиготными или гомозиготными по гену, кодирующему SDS-подобный белок циклина дикого типа, депонированный Nunhems B.V. под NCIMB 42532. 25% таких семян содержат аллель дикого типа SEQ ID NO: 25 в гомозиготной форме, кодирующий белок дикого типа SEQ ID NO: 26. Другие мутантные аллели гена *Emb1* могут быть получены самостоятельно, например, путем мутагенеза или другими способами, известными специалисту в данной области. Геномная нуклеотидная последовательность *Emb1*, обозначенная SEQ ID NO: 25, кодирует SDS-подобный белок циклина дикого типа *Citrullus lanatus* с аминокислотной последовательностью, обозначенной SEQ ID NO: 26. Последовательность мРНК, обозначенная SEQ ID NO: 27, и мутантный белок, обозначенный SEQ ID NO: 28, представляет собой мутантный аллель *emb1*, обнаруженный в семенах, депонированных под номером NCIMB42532.

Мутантный аллель *emb1* дает растению мужскую фертильность, но при этом дает бессемянные плоды, когда растение гомозиготно по мутантному аллелю. Мутация в гене *Emb1* может быть любой мутацией, включая делеции, укорочения, вставки, точечные мутации, нонсенс-мутации, миссенс-мутации или несинонимичные мутации, мутации сайта сплайсинга, мутации сдвига рамки считывания и/или мутации в регуляторных последовательностях. Мутация предпочтительно представляет собой точечную мутацию и/или мутацию сайта сплайсинга. Мутация может происходить в последовательности ДНК, содержащей кодирующую последовательность гена, кодирующего циклино-SDS-подобный белок (ген *Emb1*), или в последовательности РНК, кодирующей циклино-SDS-подобный белок, либо она может наблюдаться в аминокислоте циклино-SDS-

подобного белка (или белка Emb1). Что касается последовательности ДНК гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, мутация может происходить в кодирующей последовательности (cds, состоит из экзонов) или в некодирующих последовательностях, таких как 5'- и 3'-нетранслируемые области, интроны, промоторы, энхансеры и т.д., гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок. Что касается РНК, кодирующей циклин-SDS-подобный белок, мутация может происходить в пре-мРНК или мРНК.

Семена диплоидных растений *Citrullus lanatus*, сегрегирующих по мутантному аллелю циклино-SDS-подобного гена, кодирующего белок, были депонированы Nunhems B.V. в соответствии с Будапештским договором под регистрационным номером NCIMB 42532 в NCIMB Ltd., Фергюсон Билдинг, Крейбстоун Истейт Баксберн Абердин AB21 9YA, Шотландия, Великобритания 27 января 2016 года. Для внесения в базу данных семян аллель гена, кодирующего циклин-SDS-подобный белок, был обозначен как emb1.

Депонированные семена были получены от самоопыляемого растения, полученного обратным скрещиванием, которое является гомозиготным по мутантному аллелю emb1 с растениями, гомозиготными по аллелю emb1 дикого типа. Таким образом, 25% депонированных семян являются гомозиготными по мутантному аллелю emb1 и дают бесплодные плоды, 50% являются гетерозиготными по мутантному аллелю, а 25% гомозиготны по аллелю дикого типа, кодирующему циклин-SDS-подобный белок дикого типа.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к диплоидному растению арбуза или части растения, содержащей, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля emb1, предпочтительно две копии, и, по меньшей мере, одна копия мутантного аллеля emb1, предпочтительно две копии мутантного аллеля emb1. В одном аспекте мутантный аллель emb1 – это аллель, обнаруженный в семенах, депонированных под номером NCIMB 42532.

В настоящем документе также рассматриваются семена, из которых может быть выращено такое диплоидное растение, равно как и части такого растения, такие как диплоидные бессемянные плоды, цветы, листья, стебли, органы вегетативного размножения, клетки, черенки, органы семенного размножения (например, самоопыления), а также клеточные или тканевые культуры *in vitro*,

равно как и пыльца, завязи, корневища, отростки и т.д. Таким образом, в одном варианте осуществления диплоидное растение или семена, из которых может быть выращено растение, или ткань или части растения (пыльца, пыльники, семяпочки) содержат мутантный аллель *war5.1*, как описано выше в Таблице 1, или другой мутантный аллель *war5.1*.

Тетраплоидные растения арбуза, содержащие мутантный аллель *war5.1*

Получение триплоидных арбузов без косточек предусматривает использование пыльцы диплоидных мужских родительских растений для опыления цветков тетраплоидных материнских растений. Опыление тетраплоидных цветков диплоидной пылью позволяет получать триплоидные семена F1 (Кихара, 1951 г., материалы Американского садоводческого общества 58: 217-230; Eigsti 1971, Hort Science 6: 1-2). Триплоидные гибридные растения, выращенные из этих семян F1, являются самобесплодными, поскольку они дают стерильную пыльцу из-за дисбаланса хромосом. Таким образом, триплоидные гибриды обычно нуждаются в опылении диплоидным опылителем для получения плодов арбуза.

Тем не менее, согласно настоящему изобретению триплоидное растение, содержащее одну, две или три копии мутантного гена *war5.1*, позволяет получать плоды без опыления, а необходимость в наличии растения-опылителя отсутствует. Таким образом, настоящей заявкой предусмотрен способ выращивания таких триплоидных растений арбуза, например, в поле, при отсутствии растений-опылителей и/или в отсутствии (фертильной) пыльцы для получения бессемянных плодов.

Таким образом, одним аспектом изобретения предусмотрены оба тетраплоидных растения, содержащих предпочтительно четыре копии рецессивного аллеля *war5.1* для использования в качестве женского родителя, и диплоидные растения, содержащие предпочтительно две копии рецессивного аллеля *war5.1* для использования в качестве мужского родителя, а также триплоидные гибриды F1 (содержащие предпочтительно три копии мутантного аллеля *war5.1*), полученные путем скрещивания диплоидного родителя мужского пола с тетраплоидным родителем женского пола.

Для получения такого тетраплоидного растения можно использовать любое из описанных выше диплоидных растений, предпочтительно гомозиготных по *war5.1*, в качестве исходного материала для получения тетраплоидных растений. Для получения тетраплоидного растения из указанных диплоидных растений могут быть использованы способы удвоения хромосом, известные специалисту в данной области техники. Например, Но и др. (2012) Hort. Environ. Biotechnol. 53(6):521-529, выполнили оценку различных способов получения тетраплоидных арбузов. Во всех способах предусмотрено использование антимиотического агента, такого как колхицин, динитоаланин или оризалин, который обеспечивает удвоение хромосом. При необходимости, можно использовать тканевую культуру для получения тетраплоидных растений из частей растений. Для подтверждения того, что растения являются тетраплоидными, может подтверждаться число хромосом. Пloidность можно легко определить с помощью подсчета хромосом, проточной цитометрии или других известных методов (Сари и др. 1999 г., Scientia Horticulturae 82: 265-277, включен в настоящий документ посредством ссылки).

Таким образом, одним аспектом изобретения предусмотрено тетраплоидное культивируемое растение арбуза вида *Citrullus lanatus*, при этом указанное растение содержит две или предпочтительно четыре копии мутантного аллеля *war5.1* (как указано выше), по одному на каждой из четырех хромосом 5.

Все варианты осуществления, описанные для мутантного аллеля *war5.1* выше в равной степени относятся к тетраплоиду. Таким образом, например, тетраплоидное растение может состоять из четырех копий одного аллеля *war5.1*, описанного в Таблице 1, или четыре копии другого мутантного аллеля *war5.1*, как описано выше.

Таким образом, в одном аспекте изобретение включает в себя тетраплоидное растение или часть растения арбуза, содержащее одну, две, три или четыре копии мутантного аллеля гена *WAP5.1*, кодирующего белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или 9. Аспекты, касающиеся мутантного аллеля *war5.1*, описанного выше применительно к диплоидным растениям арбуза, содержащим одну или две копии мутантного аллеля *war5.1*, применимы к тетраплоидным растениям и частям растений. Так, например, в одном аспекте мутантный аллель приводит к снижению или

отсутствии экспрессии гена WAP5.1, либо мутантный аллель кодирует мутантный белок WAP5.1 со сниженной или отсутствующей функцией.

В одном аспекте тетраплоидное растение содержит две или предпочтительно четыре копии мутантного аллеля war5.1, который кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10, содержащий аминокислотную замену L528F в LRR-домене.

Генотипирование тетраплоидных растений или их частей (клеток, листьев, ДНК и т.д.) можно выполнять так же, как и для диплоидов, используя, например, аллель-специфическую ПЦР для различения генотипов SNP, т.е. растения или части, содержащие TTTT для маркера mwm233348429 в нуклеотиде 61 SEQ ID NO: 8 (обнаружение четырех мутантных аллелей war5.1, кодирующих белок SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10, содержащий мутацию L528F), можно отличить от растений или частей, содержащих CTTT (обнаружение трех мутантных аллелей, кодирующих белок SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10), CCTT (обнаружение двух мутантных аллелей, кодирующих белок SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10), CCCT (обнаружение одной мутантной аллели, кодирующей белок SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10) или CCCC (обнаружение четырех аллелей дикого типа, кодирующих белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9) для маркера mwm233348429 в нуклеотиде 61 SEQ ID NO: 8 в геноме. То же самое относится и к другим аллель-специфическим маркерам.

В одном аспекте изобретения предусмотрен тетраплоидный арбуз, имеющий, по меньшей мере, одну, или две, или три копии мутантного аллеля war5.1 (как указано выше), но предпочтительно содержащий четыре копии мутантного аллеля war5.1 (как указано выше). Предпочтительно растение арбуза представляет собой тетраплоидную инбредную женскую линию, подходящую в качестве родительского растения для получения гибридных семян F1.

Тетраплоидная женская инбредная линия может быть получена с использованием диплоидного растения, содержащего одну или предпочтительно две копии аллеля war5.1 для удвоения хромосом и получения тетраплоидного растения. Например, диплоидную инбредную линию, которая является гомозиготной по war5.1, можно использовать для получения тетраплоидного растения.

Тетраплоидное растение, включающее в себя четыре копии мутантного аллеля *wap5.1*, будет экспрессировать фенотип, т.е. являться факультативно партенокарпическим.

Семена, из которых может быть выращено такое тетраплоидное растение, также предусмотрены настоящим документом, равно как и части такого растения, такие как тетраплоидные бессемянные плоды, полученные в отсутствие опыления, цветы, листья, стебли, черенки, органы вегетативного размножения, клетки, органы семенного размножения (например, органы самоопыления), а также клеточные или тканевые культуры *in vitro*, а также пыльца, завязи, корневища, отростки и т.д. Таким образом, в одном варианте осуществления тетраплоидное растение или семена, из которых может быть выращено растение, или ткань или части растения (пыльца, пыльники, семязачатки) содержат мутантный аллель *wap5.1*, как описано выше.

Тетраплоид может включать в себя различные мутантные аллели *wap5.1*, например, два мутантных аллеля *wap5.1*, кодирующих укороченный белок WAP5.1 и два мутантных аллеля *wap5.1*, кодирующих белок WAP5.1, имеющий аминокислотную замену. Такие растения можно получить, например, путем получения сначала диплоида, содержащего различные мутантные аллели *wap5.1*, а затем обеспечив удвоение хромосом такого диплоида. Однако в одном аспекте тетраплоид содержит четыре копии одного и того же мутантного аллеля *wap5.1*, то есть тетраплоид происходит от диплоида, гомозиготного по аллелю *wap5.1*.

Триплоидные растения арбуза, содержащие мутантные аллели *wap5.1*

Еще в одном аспекте предусмотрены триплоидные семена арбуза, растения и части растений, содержащие одну, две или три копии мутантного аллеля *wap5.1*, т.е. *wap5.1 /WAP5.1/WAP5.1* или *wap5.1 /wap5.1 /WAP5.1* или соответственно *wap5.1 /wap5.1 /wap5.1*. Такие триплоиды могут быть получены в соответствии с описанием выше и как показано в Таблице 2 ниже:

Таблица 2

	Женский тетраплоидный родитель	Мужской диплоидный родитель	Генотип триплоидного семени F1, полученного путем
--	--------------------------------	-----------------------------	---

			опыления женского тетраплоида пыльцой мужского диплоида
A	<i>wap5.1 / wap5.1 / wap5.1 / wap5.1</i>	<i>wap5.1 / wap5.1</i>	<i>wap5.1 / wap5.1 / wap5.1</i>
B	<i>wap5.1 / wap5.1 / wap5.1 / wap5.1</i>	WAP5.1/WAP5.1	<i>wap5.1 / wap5.1 / WAP5.1</i>
C	WAP5.1/ WAP5.1/ WAP5.1/ WAP5.1	<i>wap5.1 / wap5.1</i>	WAP5.1/WAP5.1/ <i>wap5.1</i>

В одном аспекте тетраплоидное растение, содержащее четыре копии мутантного аллеля *wap5.1*, используется в качестве материнского растения и опыляется пыльцой диплоидного мужского растения-родителя, содержащего две копии мутантного аллеля *wap5.1*, а семена от скрещивания собирают. Эти семена триплоидны и содержат три копии мутантного аллеля *wap5.1* по изобретению (таблица 2, строка А). Растения, выращенные из этих семян, дают арбузные плоды без косточек (триплоидные плоды) без необходимости опыления, чтобы вызвать завязывание плодов. Триплоидные гибридные растения, выращенные из таких триплоидных семян F1, являются самобесплодными, поскольку они производят стерильную пыльцу из-за хромосомного дисбаланса. Таким образом, эти семена можно выращивать на производственных полях без использования растений-опылителей. Это первый случай, когда бессемянные триплоидные плоды арбуза могут быть получены в отсутствие пыльцы и растений-опылителей.

В одном аспекте триплоид в соответствии с пунктом А выше содержит три идентичных мутантных аллеля *wap5.1*, т.е. женский и мужской родители содержат один и тот же мутантный аллель. Тем не менее, в другом аспекте родитель женский и мужской родители могут содержать разные мутантные аллели *wap5.1*. Например, женский родитель может содержать четыре мутантных аллеля *wap5.1*, кодирующих усеченный белок WAP5.1, а мужской родитель может содержать два мутантных аллеля *wap5.1*, кодирующих белок WAP5.1 с аминокислотной заменой, например, Лейцин 528 SEQ ID NO: 1 или 9 (или последовательность, которая, по меньшей мере, на 95% идентична любой из них) заменяется фенилаланином (мутант L528F) или наоборот.

В одном аспекте мутантный аллель *war5.1*, придающий факультативную партенокарпию, описанный в настоящем документе, сочетают с другим мутантным аллелем, придающим партенокарпию, в частности, придающим факультативную партенокарпию. Такой другой мутантный аллель представляет собой, например, аллель *wor1*, описанный в заявке WO2018/060444, который расположен на хромосоме 4 (также именуемый *war4.1*). В одном аспекте мутантный аллель *war5.1* комбинируют с мутантным аллелем *wor1* в диплоидных, триплоидных или тетраплоидных растениях арбуза. Поскольку *wor1* находится на другой хромосоме, можно создавать различные комбинации с *wor1* и *war5.1*, например, по три мутантных копии *wor1* и *war5.1* в триплоидном арбузе, или одна или две мутантные копии *wor1* и три мутантные копии *war5.1* в триплоидном арбузе или наоборот и т.д.

Для коммерческой реализации предпочтительно подходят триплоидные бессемянные плоды. Они предпочтительно имеют средний показатель по шкале Брикса, по меньшей мере, 6,0, 7,0, 8,0; или предпочтительно, по меньшей мере, 9,0; предпочтительно, по меньшей мере, 10,0; более предпочтительно, по меньшей мере, 11,0. Плоды могут быть любого размера, формы, цвета и текстуры. Предпочтительно, когда цвет мякоти плодов при созревании является однородным. В одном аспекте мякоть плода красная или темно-красная.

Средняя масса плода триплоидного гибрида, содержащего *war5.1* в трех копиях, может составлять не менее 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 кг. В еще одном варианте реализации изобретения средняя масса плода триплоидного гибрида, содержащего *war5.1* в трех копиях, может составлять не более 5 кг, т.е. 4, 3, 2, 1,5 или 1 кг или даже меньше.

Бессемянные плоды могут быть любыми по форме (например, продолговатыми, овальными, блочными, сферическими или круглыми), поверхности плода (бороздчатой, гладкой), цвету мякоти (красный, темно-красный, алый, кораллово-красный, оранжевый, лососевый, розовый, розовато-красный, желтый, канареечно-желтый или белый), цвету кожуры (например, светло-зеленый, темно-зеленый, зеленый с узкими, средними или широкими полосами, оттенки серого, с пятнами или без них, золотисто-желтый), толщине кожуры, прочности кожуры, узору кожуры (например, полосатый, неполосатый,

сетчатый), структуре мякоти/плотности мякоти, содержанию ликопина и/или витаминов, различному соотношению сахара и кислоты, фруктовому вкусу и т.д.

Таким образом, мутантный аллель *war5.1* можно использовать для выведения ряда бессемянных сортов, дающих плоды разной формы и размера и т.д. путем традиционной селекции. См. Guner and Wehner 2004, Hort Science 39(6): 1175-1182, в частности, стр. 1180-1181, где приведено описание генов и характеристик плодов, придаваемых этими генами. В целом, важными целями селекции являются ранняя зрелость, высокая урожайность плодов, высокое внутреннее качество плодов (хороший однородный цвет, высокое содержание сахара, правильное соотношение сахара и кислоты, хороший вкус, высокое содержание витаминов и ликопина, плотная текстура мякоти, неволокнистая текстура мякоти без таких дефектов, как полая сердцевина, некроз кожуры, вершинная гниль или перекрестное растрескивание, а также положительные характеристики кожуры и устойчивость к растрескиванию).

Семена, из которых могут быть выращены указанные триплоидные гибридные растения F1, представляют собой один аспект изобретения. Таким образом, в одном аспекте предусмотрен способ выращивания триплоидных растений арбуза/получения бессемянных плодов арбуза, включающий следующие этапы посева или посадки триплоидных растений арбуза, содержащих один, два или три мутантных аллеля *war5.1* в своем геноме, в качестве варианта без опыления цветков (например, за счет мужской стерильности, отсутствия опылителей и/или отсутствия пыльцы) и сбора бессемянных плодов арбуза, которые формируются в отсутствие опыления посредством партенокарпии. В принципе, отсутствие опыления не требуется, поскольку триплоидные плоды в любом случае дают бессемянные плоды. Различие состоит в том, что триплоидам, содержащим мутантный(-ые) аллель(-и) *war5.1* не нужна пыльца, чтобы обеспечить формирование плодов, соответственно участок для выращивания может быть полностью занят триплоидными растениями, и необходимость в промежуточной высадке растений-опылителей отсутствует.

Также для диплоидных растений арбуза, содержащих две копии мутантного аллеля *war5.1* предусмотрен способ получения бессемянных плодов. Таким образом, в одном аспекте предусмотрен способ выращивания диплоидных растений арбуза/получения бессемянных плодов арбуза, включающий стадии

посева или посадки диплоидных растений арбуза, содержащих в своем геноме две копии мутантного аллеля *war5.1*, что препятствует опылению цветков (например, в результате мужской стерильности, отсутствия опылителей и/или отсутствия пыльцы) и сбора бессемянных плодов арбуза, которые формируются в отсутствие опыления посредством партенокарпии. Для диплоидного выращивания необходимо предотвратить опыление женских цветков, так как в противном случае плоды будут содержать семена. Опыление можно предотвратить различными средствами или их сочетанием, например, путем выращивания растений в защищенных условиях, в которых отсутствует пыльца, за счет обеспечения мужской стерильности растений и/или отсутствия образования пыльцы, создания разницы во времени между формированием пыльцы и открытием женских цветков, удаления мужских цветков и т.д.

Применительно к триплоидным семенам и триплоидных растений, содержащих только одну или две копии мутантного аллеля *war5.1* по изобретению (как указано в Таблице 2 выше, строки В и С), фенотип не тестировался, но они также могут быть пригодны для получения бессемянных плодов без пыльцы, и их также могут выращиваться в поле без растений-опылителей. В любом случае триплоидные растения и семена, из которых такие растения могут быть получены, являются аспектом изобретения, равно как и их части и триплоидные плоды, которые дают такие растения. Указанные триплоидные плоды предпочтительно подходят для продажи. Они предпочтительно имеют средний показатель по шкале Брикса, по меньшей мере, 6,0, 7,0, 8,0; или предпочтительно, по меньшей мере, 9,0; предпочтительно, по меньшей мере, 10,0; более предпочтительно, по меньшей мере, 11,0. Плоды могут быть любого размера, формы, цвета и текстуры. Предпочтительно, когда цвет мякоти плодов при созревании является однородным. В одном аспекте мякоть плода красная или темно-красная.

В одном аспекте триплоидное растение по изобретению размножается вегетативно.

Также предусмотрен способ получения триплоидных гибридных семян арбуза, причем триплоидные растения, выращенные из таких семян, дают плоды в отсутствие опыления, причем указанный способ включает в себя:

- (a) получение факультативного партенокарпического диплоидного растения арбуза и факультативного партенокарпического тетраплоидного растения (см., например, таблицу 2, строка А),
- (b) возможность опыления пестичных цветков тетраплоидного растения пыльцой диплоидного растения, и
- (c) сбор семян, полученных из плодов тетраплоидного растения, и, при необходимости,
- (d) сушку собранных семян.

При необходимости, высушенные и собранные семена F1 впоследствии упаковывают. Перед упаковкой также может проводиться их обработка. Таким образом, упаковка или тара, которая содержит или состоит из семян, полученных указанным способом, представляют собой один из вариантов осуществления настоящего изобретения.

Также предложен способ получения триплоидных гибридных семян арбуза, который включает в себя:

- (a) получение диплоидного растения арбуза без мутантного аллеля war5.1 и тетраплоидного растения, содержащего четыре копии мутантного аллеля war5.1 (см., например, таблицу 2, строка В), или получение диплоидного растения арбуза, гомозиготного по мутантному аллелю war5.1 и тетраплоидное растение без мутантного аллеля war5.1 (например, таблица 2, строка С),
- (b) возможность опыления пестичных цветков тетраплоидного растения пыльцой диплоидного растения, и
- (c) сбор семян, полученных из плодов тетраплоидного растения, и, при необходимости,
- (d) сушку собранных семян.

При необходимости, высушенные и собранные семена F1 впоследствии упаковывают. Перед упаковкой также может проводиться их обработка. Таким образом, упаковка или тара, которая содержит или состоит из семян, полученных указанным способом, представляют собой один из вариантов осуществления настоящего изобретения.

В рамках настоящего документа также рассматриваются семена, из которых выращивают любые вышеперечисленные триплоидные растения, равно как и части такого растения, такие как триплоидные плоды, цветы, листья, стебли, черенки, вегетативно размножающиеся растения, клетки, растения, которые размножаются семенами (например, путем самоопыления), клеточные или тканевые культуры *in vitro*, а также пыльца, завязи, корневища, отростки и т.д. Таким образом, в одном варианте осуществления триплоидное растение или семена, из которых может быть выращено растение, или ткань или части растения (пыльца, пыльники, семязачатки) содержат мутантный аллель *war5.1*, как указано выше.

Также предусмотрен способ выращивания триплоидных растений, содержащих, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *war5.1*. Триплоидные растения со стеноспермокарпических заменены на партенокарпические, то есть больше отсутствует необходимость в растениях-опылителях для того, чтобы стимулировать развитие плодов из цветков, соответственно эти растения можно выращивать в отсутствие растений-опылителей, получая бессемянные плоды. Таким образом, все поле или теплицу можно засеять исключительно триплоидными растениями, увеличив урожай бессемянных триплоидных плодов. Настоящим документом также предусмотрены бессемянные плоды, содержащие в своем геноме, по меньшей мере, одну копию (или две или три копии) мутантного аллеля *war5.1*, равно как и пищевые и кормовые продукты, содержащие фрукты или части фруктов.

Таким образом, способ включает в себя посев или выращивание триплоидных растений арбузов, содержащих, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *war5*. в рамках посевной площади, такой как поле, теплица или туннель, без присутствия растений-опылителей (например, без промежуточной высадки растений-опылителей), что позволяет плодам развиваться без опыления цветов (партенокарпически), а также, при необходимости, сбор триплоидных бессемянных плодов.

Вегетативное размножение и клеточные или тканевые культуры

Указанные выше диплоидные растения, тетраплоидные растения или триплоидные растения (равно как и другие полиплоиды) также могут быть воспроизводиться вегетативно (клонально), при этом такие вегетативно

размножающиеся растения или «растения с вегетативной формой размножения» являются вариантом осуществления изобретения. Их легко отличить от других растений арбуза, огурца или дыни по наличию мутантного аллеля *war5.1* и/или фенотипически. Наличие одного или более мутантных аллелей *war5.1* определяется в порядке, описанном по тексту настоящего документа.

Растения с вегетативной формой размножения можно получить разными способами. Например, один или более черенков растения по настоящему изобретению могут быть привиты к другому подвою, например, подвою, который демонстрирует устойчивость к биотическим или абиотическим стрессам.

Другие методы включают в себя методы получения клеточных или тканевых культур *in vitro*, а также регенерацию вегетативно размножающихся растений из таких культур. Такие клеточные или тканевые культуры состоят из различных клеток или тканей растения по изобретению или содержат их. В одном аспекте такая клеточная или тканевая культура состоит из вегетативных клеток или вегетативных тканей растения по изобретению или содержит их.

В другом аспекте культура клеточная или тканевая культура состоит из репродуктивных клеток или тканей, таких как пыльники или семязачатки растения по изобретению, или содержит их. Такие культуры можно обрабатывать агентами для удвоения хромосом с тем, чтобы, например, получить двойные гаплоидные растения, либо их можно использовать для получения гаплоидных растений (например, для получения диплоидов из тетраплоида или для получения гаплоидов из диплоида).

Клеточная или тканевая культура *in vitro* может, таким образом, включать в себя или состоять из клеток или протопластов или растительной ткани из части растения, выбранной из группы, состоящей из плода, зародыша, меристемы, семядоли, пыльцы, семязачатка, листа, пыльника, корня, кончика корня, пестика, цветка, семени, стебля. Она также включает в себя части любого из них, как, например, только семенную кожуру (материнскую ткань).

Таким образом, как указано выше, одним аспектом изобретения предусмотрена клеточная или тканевая культура растения, содержащая одну, две, три или четыре копии мутантного аллеля *war5.1*. Как указано выше, клеточная или тканевая культура включает в себя клетки или протопласты или растительную

ткань из растительной части растения, содержащего мутантный аллель *war5.1*, может включать в себя или состоять из клеток или тканей, выбранных из группы, состоящей из зародыша, меристемы, семядоли, пыльцы, листа, пыльника, корня, кончика корня, пестика, цветка, семени, стебля или части любого из них.

Также предусмотрено растение арбуза, огурца или дыни, регенерированное из такой клеточной или тканевой культуры, причем регенерированное растение (или его потомство, например, полученное после самоопыления регенерированного растения) содержит мутантный аллель *war5.1*. Следовательно, в одном аспекте растение арбуза, огурца или дыни, содержащее одну или более копий мутантного аллеля *war5.1*, представляет собой вегетативно размножающееся растение арбуза, огурца или дыни.

В другом аспекте клетки и ткани по изобретению (а также, при необходимости, клеточные или тканевые культуры), содержащие одну или более копий *war5.1* являются неразмножающимися клетками или тканями.

Способы

Предлагается способ получения бессемянных триплоидных плодов арбуза, при этом указанный способ включает:

1. получение триплоидного гибридного (F1) растения или семени арбуза, содержащего, по меньшей мере, одну, предпочтительно две или предпочтительно три копии мутантного аллеля *war5.1*,
2. посадку или посев указанных триплоидных гибридных растений в поле, предпочтительно без посадки или посева диплоидных растений-опылителей на том же поле, и, при необходимости,
3. сбор бессемянных плодов арбуза, полученных на триплоидных растениях, причем плоды предпочтительно получают без опыления женских цветков.

В одном аспекте в рамках этапа 1 триплоидное гибридное растение предпочтительно не прививают на другой подвой. В другом аспекте оно может быть привито на другой подвой.

Как уже указывалось выше, отсутствует необходимость получать диплоидные растения-опылители для завязывания плодов на женских цветках триплоидных растений. Это означает, что все поле можно засеять или пересадить,

по сути, только семенами или рассадой триплоидных семян или растений F1. Таким образом, значительно повышается урожайность бессемянных плодов арбуза с гектара. Кроме того, значительно упрощается процесс посева и посадки, поскольку высевается или высаживается только один генотип.

Таким образом, способ также может быть описан как способ получения бессемянных плодов арбуза, причем указанный способ включает в себя выращивание триплоидного растения, содержащего, по меньшей мере, одну, предпочтительно две, более предпочтительно три копии мутантного аллеля *wap5.1* и получение урожая плодов от указанных растений. Плоды формируются предпочтительно без опыления женских цветков, т.е. в отсутствие жизнеспособной или фертильной пыльцы. Для завязывания плодов больше не нужны насекомые, такие как пчелы, т.е. нет необходимости размещать пчелиные ульи на полях или рядом с ними.

Собранные триплоидные бессемянные плоды могут упаковываться для продажи в свежем виде или для переработки. Также предусмотрено получение указанным выше способом плодов, содержащих один, два или три аллеля *wap5.1*. При необходимости, для различения плодов выполняется обнаружение мутантного аллеля *wap5.1*, например, путем обнаружения мутантного аллеля *wap5.1* с использованием обнаружения ДНК, РНК или белка, как описано в других разделах настоящего документа, например, с помощью ПЦР, генотипирования или маркерного анализа маркеров, сцепленных (или тесно сцепленных) с аллелем *wap5.1* или на основании аллель-специфичности (например, путем обнаружения мутации, которая отличает мутантный аллель от аллеля дикого типа). Таким образом, в одном варианте осуществления предусмотрены собранные триплоидные плоды (т.е. *wap5.1/WAP5.1/WAP5.1* или *wap5.1/wap5.1/wap5.1* или *wap5.1/wap5.1/wap5.1*), такие как упакованные целые фрукты или части фруктов и/или переработанные фрукты или части фруктов.

Также предусмотрен способ получения факультативного партенокарпического культивируемого растения арбуза, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений арбуза или получение мутантной популяции растений арбуза;

- b) селекцию растения, дающего бессемянные плоды без опыления женских цветков, а также дающего семенные плоды после опыления женских цветков и/или отбора растения, содержащего мутантный аллель гена WAP5.1;
- c) при необходимости, проверку того, содержит ли растение, выбранное в соответствии с подпунктом b), мутантный аллель гена WAP5.1; а также
- d) при необходимости, выращивание растений, полученных на этапе c).

Предусмотрено получение растения арбуза указанным выше способом.

Популяция растений арбуза согласно подпункту а) предпочтительно представляет собой один генотип культивируемой селекционной линии или сорта арбуза, который обработан/был обработан (или подвергнулся воздействию) мутагенным агентом, или потомство такой популяции, например, полученное после самоопыления особей популяции для получения растений M2, M3 или последующих генераций. Например, это может быть популяция TILLING.

На этапе b) растения скринируют на фенотип, т.е. на предмет того, что они являются факультативными партенокарпическими, и/или растения (или части растений, или их ДНК) скринируют на наличие мутантного аллеля гена WAP5.1, т.е. аллеля, который либо имеет сниженную или отсутствующую экспрессию белка WAP5.1 дикого типа или аллеля, кодирующего мутантный белок WAP5.1. В части касающейся скрининга на фенотип, очевидно, что без опыления женских цветков развиваются бессемянные плоды; при опылении женских цветков развиваются семянные плоды. Такой фенотипический скрининг можно выполнять в несколько этапов. Например, первые растения можно выращивать в условиях отсутствия насекомых, при этом мужские цветки можно удалить. В случае с женскими цветками можно визуальное наблюдать за цветением и развитием плодов (в отсутствие пыльцы). Созревшие плоды можно разрезать пополам, чтобы убедиться, что они являются бессемянными. Выбранные растения могут, например, размножаться вегетативно, что подтверждает партенокарпический фенотип и/или, например, цветы могут опыляться вручную, что позволяет увидеть, являются ли плоды сеянными при опылении (факультативная партенокарпия). В том, что касается скрининга растений на наличие мутантного аллеля гена WAP5.1, то его можно выполнять различными методами для выявления ДНК, РНК или белка

war5.1, например, путем получения праймеров для ПЦР, которые амплифицируют часть кодирующей области или всю кодирующую область для амплификации геномной ДНК для того, чтобы определить, содержит ли растение мутацию в геномной ДНК, а также другими способами.

Этап с) может включать в себя различные способы определения наличия мутантного аллеля war5.1. Например, можно провести маркерный анализ или анализ последовательности участка хромосомы, содержащего локус WAP5.1, или использовать ПЦР или ОТ-ПЦР для амплификации аллеля war5.1 (или его части) либо мРНК (кДНК). Также может выполняться генетический анализ для определения рецессивного наследования.

Также предусмотрено использование факультативного партенокарпического растения арбуза для получения бессемянных плодов арбуза, желательно без опыления женских цветков растения. Предусмотрено дальнейшее использование мутантного аллеля war5.1 для получения факультативных партенокарпических растений арбуза и/или бессемянных плодов арбуза в отсутствие опыления женских цветков. Аналогичным образом настоящим документом предусмотрено использование мутантного аллеля war5.1 гена WAP5.1 по изобретению для получения факультативных партенокарпических растений арбуза.

В одном аспекте растения, части растений и растительные клетки согласно изобретению получают не только с помощью по существу биологического процесса, как это определено правилом 28 (2) ЕПК (Европейская патентная конвенция).

В одном аспекте растения не относятся к ГМО (генномодифицированным).

В одном аспекте мутантные аллели генерируются путем мутагенеза (например, химического или радиационного мутагенеза) или путем направленного мутагенеза, в частности, с использованием системы CRISPR (например, Crispr/Cas9 или Crispr/CpfI или других нуклеаз). В одном аспекте культивируемое растение, которое содержит мутантный аллель war5.1 не является трансгенным растением, т.е. отбирают нетрансгенное потомство, которое не содержит, например, систему CRISPR.

В одном аспекте мутантный аллель гена WAP5.1 содержит мутацию, индуцированную человеком, т.е. мутацию, полученную методами мутагенеза, такими как химический мутагенез или радиационный мутагенез, или методами направленного мутагенеза, такими как методы на основе Crispr.

В настоящем документе представлен метод направленного мутагенеза эндогенного гена WAP5.1 в арбузе, дыне и огурце с использованием любого метода направленной модификации гена, такого как методы, основанные на CRISPR (например, Crispr/Cas9 или Crispr/CpfI), TALENS, Zinc Fingers или другие методы.

В одном аспекте предусмотрен выделенный мутантный белок WAP5.1 и выделенный белок WAP5.1 дикого типа или выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая мутантный белок WAP5.1 или белок WAP5.1 дикого типа. Также настоящим документом предусмотрено антитело, способное связываться с мутантным белком WAP5.1 или белком дикого типа.

Методы обнаружения

В одном аспекте предложен способ скрининга для идентификации и/или селекции семян, растений или частей растений или ДНК из таких семян, растений или частей растений, содержащих в своем геноме мутантный аллель гена, кодирующего белок WAP5.1.

Этот способ включает скрининг на уровне ДНК, РНК (или кДНК) или белка с использованием известных методов обнаружения присутствия мутантного аллеля. Существует много методов обнаружения мутантного аллеля гена.

Таким образом, способ скрининга и/или селекции растений, или растительного материала, или частей растения, или ДНК, или РНК, или полученного из них белка на наличие мутантного аллеля *wap5.1* обеспечивается за счет одного или более следующих этапов:

- a) определение наличия сниженной или отсутствующей экспрессии эндогенного гена WAP5.1;
- b) определение сниженного количества или отсутствующего белка WAP5.1 дикого типа;
- c) определение наличия мутантной мРНК, кДНК или геномной ДНК, кодирующей мутантный белок WAP5.1;
- d) определение наличия мутантного белка WAP5.1;

- е) определение того, являются ли растения или их потомство факультативными партенокарпиками.

Можно применять традиционные методы, такие как ОТ-ПЦР, ПЦР, анализы на основе антител, секвенирование, анализы генотипирования (например, аллель-специфическое генотипирование), фенотипирование и т.д.

Растения или растительный материал или части растений могут представлять собой растения арбуза, огурца или дыни, или растительные материалы или части растений, такие как листья, части листьев, клетки, плоды, части плодов, завязи, стебель, гипокотиль, семена, части семян, семенная оболочка, зародыш и т.д.

Например, если между диким типом и мутантным аллелем существует разница в один нуклеотид (однонуклеотидный полиморфизм, SNP), для определения того, содержит ли растение или часть растения или клетка растения нуклеотид дикого типа или мутантный нуклеотид в своем геноме, можно использовать SNP-генотипирование. Например, SNP может с легкостью идентифицироваться путем KASP-анализа (аллель-специфическая ПЦР, см. kpbioscience.co.uk) или других методов SNP-генотипирования. Для KASP-анализа можно выбрать, например, 70 предшествующих пар оснований и 70 последующих пар оснований вниз от SNP, и могут быть сконструированы два аллель-специфичных прямых праймера и один аллель-специфический обратный праймер. См., например, Allen et al. 2011, *Plant Biotechnology J.* 9, 1086-1099, в частности, KASP-анализ описан на стр. 097-1098.

Также можно использовать другие анализы генотипирования. Например, также может использоваться анализ генотипирования TaqMan SNP, высокоразрешающее плавление (HRM), чипы SNP-генотипирования (например, Fluidigm, Illumina и т.д.) или секвенирование ДНК.

В другом аспекте, например, SNP-маркер *mwm23348429* в нуклеотиде 61 SEQ ID NO: 8 или в нуклеотиде 61 последовательности, которая, по меньшей мере, на 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8, можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия мутантного аллеля *war5.1*, кодирующий мутантный белок, содержащий аминокислотную замену L528F в арбузе, аминокислотную

замену L535F в огурце или аминокислотную замену L538F в дыне. На основе различий между геномной последовательностью аллеля дикого типа и мутантного аллеля, специалист в данной области может легко разработать маркеры, которые можно использовать для обнаружения конкретных аллелей.

В настоящем документе также предусмотрен способ идентификации растения арбуза, огурца или дыни (или части растения), содержащего мутантный аллель war5.1, способ, включающий обнаружение в растении (или части растения) мутантного аллеля war5.1, причем наличие определяется, по меньшей мере, одним маркером в пределах аллеля war5.1 или путем обнаружения белка, кодируемого аллелем war5.1. Способ обнаружения мутантного аллеля war5.1 выбирают из группы, состоящей из ПЦР-амплификации, секвенирования нуклеиновых кислот, гибридизации нуклеиновых кислот и анализа на основе антител (например, иммуноанализа) для обнаружения белка war5.1, кодируемого аллелем.

В настоящем документе также предусмотрен способ идентификации растения арбуза, огурца или дыни (или части растения), содержащего мутантный аллель war5.1, включающий мутацию в регуляторном элементе, причем такой способ включает в себя обнаружение в растении (или части растения) сниженной или отсутствующей экспрессии гена мутантного аллеля war5.1, причем присутствие определяют по уровням мРНК (кДНК) аллеля WAP5.1 дикого типа или по уровням белка WAP5.1 дикого типа. Способ обнаружения мутантного аллеля war5.1 выбирают из группы, состоящей из ПЦР-амплификации (например, ОТ-ПЦР), секвенирования нуклеиновых кислот, вестерн-блоттинга и анализа на основе антител (например, иммуноанализа) для обнаружения белка WAP5.1, кодируемого аллелем.

Также настоящим документом предусмотрен способ определения, обнаружения или анализа на предмет наличия в клетке, растении или части растения арбуза мутантного аллеля гена WAP5.1, кодирующего белок SEQ ID NO: 1 или 9, или белок, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97% или 98% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1 или 9. В одном аспекте способ включает в себя определение экспрессии аллеля, и/или определение кодирующей последовательности аллеля, и/или определение части кодирующей последовательности аллеля (например, генотипа SNP аллеля), и/или определение аминокислотной последовательности продуцируемого белка и/или количества

продуцируемого белка. То же самое относится к способу определения, выявления или анализа наличия в клетке, растении или части растения огурца или дыни мутантного аллеля гена WAP5.1, кодирующего белок SEQ ID NO: 2, или белка, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97% или 98% идентичен последовательности SEQ ID NO: 2 (огурец), белка SEQ ID NO: 3, или белка, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97% или 98% идентичен последовательности SEQ ID NO: 3 (дыня).

Для определения наличия в растении или его части мутантного аллеля *wap5.1* по изобретению можно использовать различные методы. Как указано выше, может быть определен уровень мРНК (или кДНК) аллеля дикого типа или уровень белка дикого типа, что позволяет определить наличие сниженной экспрессии или отсутствие экспрессии аллеля дикого типа. Кроме того, можно выполнить анализ кодирующей последовательности или ее части, например, если уже известно, какой мутантный аллель может присутствовать, можно разработать анализ для обнаружения мутации, например, анализ генотипирования SNP, например, позволяет определять наличие мутантного аллеля и аллеля дикого типа, т.е. выполнять генотипирование по маркеру *mwm23348429*.

Способ селекции растения или семян, включающий следующие этапы:

- a) идентификацию растения или семени, которое имеет мутацию в аллеле гена, кодирующего белок WAP5.1, причем аллель гена дикого типа кодирует белок WAP5.1, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичен любому из белков, выбранных из группы: SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 3, а также, при необходимости,
- b) определение, является ли растение или растение-потомок, полученное в результате самоопыления, факультативным партенокарпиком, а также, при необходимости,
- c) селекцию растения или семени, содержащего, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля этапа a).

Способ получения растения, предпочтительно растения арбуза, дыни или огурца, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений или семян,

- b) селекцию растения, дающего бессемянные плоды в отсутствие опыления и семянные плоды после опыления и/или селекции растения или семян, содержащих в своем геноме мутантный аллель *wap5.1*,
- c) при необходимости, проверку наличия в отобранном растении согласно b), мутации в аллеле, кодирующем белок WAP5.1, и, при необходимости,
- d) выращивание или культивирование растения или семян, полученных в соответствии с этапом c),

причем аллель гена дикого типа кодирует белок WAP5.1, который, по меньшей мере, на 95% идентичен любому из белков, выбранных из группы: SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 3.

Способ получения растения, включающий следующие этапы:

- a) введение чужеродной молекулы нуклеиновой кислоты в растение, при этом чужеродная молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, включающей в себя:
 - i) молекулы ДНК, которые кодируют, по меньшей мере, одну антисмысловую РНК, вызывающую снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок WAP5.1;
 - ii) молекулы ДНК, которые за счет ко-супрессивного эффекта приводят к снижению экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок WAP5.1;
 - iii) молекулы ДНК, кодирующие, по меньшей мере, один рибозим, расщепляющий специфические транскрипты эндогенного гена, кодирующего белок WAP5.1;
 - iv) молекулы ДНК, которые одновременно кодируют, по меньшей мере, одну антисмысловую РНК и, по меньшей мере, одну смысловую РНК, при этом указанная антисмысловая РНК и указанная смысловая РНК образуют двухцепочечную молекулу РНК, которая вызывает снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок WAP5.1 (технология РНКи);
 - v) молекулы нуклеиновой кислоты, введенные с помощью мутагенеза *in vivo*, в результате чего получена мутация или вставка гетерологичной последовательности в эндогенный ген, кодирующий белок WAP5.1,

причем мутация или вставка вызывает снижение экспрессии гена, кодирующего белок WAP5.1, или приводит к синтезу белка WAP5.1 с отсутствующей или сниженной функцией;

- vi) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело, при этом антитело приводит к снижению активности эндогенного гена, кодирующего белок WAP5.1, вследствие связывания антитела с эндогенным белком WAP5.1;
- vii) молекулы ДНК, которые содержат транспозоны, при этом интеграция этих транспозонов приводит к мутации или вставке в эндогенный ген, кодирующий белок WAP5.1, что приводит к снижению экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок WAP5.1, или синтезу неактивного белка;
- viii) молекулы Т-ДНК, которые в результате вставки в эндогенный ген, кодирующий белок WAP5.1, вызывают снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок WAP5.1, или приводят к синтезу отсутствующей или сниженной функции белка WAP5.1;
- ix) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие редко расщепляющие эндонуклеазы или индивидуально подобранные редко расщепляющиеся эндонуклеазы, предпочтительно мегануклеазу, TALEN или систему CRISPR/Cas.
- b) селекцию растения, причем, при необходимости, растение или потомство растения, полученное в результате самоопыления, дает бессемянные плоды в отсутствие опыления и семянные плоды после опыления
- c) при необходимости, проверку на предмет наличия в растении, отобранном в соответствии с b), пониженной активности белка WAP5.1, по сравнению с растениями дикого типа, в геном которых, например, никакие чужеродные молекулы нуклеиновой кислоты не были интегрированы,
- d) выращивание/культивирование растений, полученных в соответствии с пунктом c).

Настоящая заявка включает в себя растение, полученное любым из вышеперечисленных способов.

В одном аспекте предусмотрено генетически модифицированное растение и часть растения, при этом в растении наблюдается сниженная или отсутствующая экспрессия эндогенного гена WAP5.1, например, путем подавления эндогенного гена WAP5.1. Таким растением может являться любое растение, в одном аспекте это арбуз, дыня или огурец. Тем не менее, им также может являться кукуруза, соя, пшеница, рапс, помидоры, хлопок и т.д.

Другим аспектом предусмотрено растение и часть растения, содержащая мутацию в эндогенном гене WAP5.1, например, индуцированную мутацию, например, за счет направленного мутагенеза, при котором экспрессия гена снижается или отсутствует, либо экспрессируемый ген кодирует сниженную функцию белка WAP5.1 или ее отсутствие, по сравнению с белком дикого типа. Как указано выше, таким растением может являться любое растение, в одном аспекте это арбуз, дыня или огурец. Тем не менее, в данном качестве также может выступать кукуруза, соя, пшеница, рапс, помидоры, хлопок, перец и т.д. Поскольку ген WAP5.1 у других видов может быть в меньшей степени идентичен последовательности гена WAP5.1 Cucurbitaceae, настоящим документом предусмотрено, что в данном аспекте изобретения ген WAP5.1 представляет собой ген, кодирующий белок, который, по меньшей мере, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3. При необходимости, ген WAP5.1 представляет собой ген, кодирующий белок, который, по меньшей мере, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3, причем белок содержит консервативный домен F-box и/или домен LRR SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3 или F-box или домен LRR, который не менее чем на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% идентичен последовательности с F-box или LRR-доменом SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3. Специалист в данной области техники может идентифицировать ортологи гена WAP5.1 у таких других видов, например, перца или томата, и таким образом получить факультативные партенокарпические растения перца или томата. Все варианты осуществления, описанные в настоящем документе применительно к арбузу, огурцу и дыне, в равной степени применимы к другим видам сельскохозяйственных культур, с той лишь разницей, что ген WAP5.1 может таким образом кодировать белок, который менее чем на 95% идентичен белку WAP5.1

дикого типа арбуза, огурца или дыни с последовательностью SEQ ID NO: 1, 9, 2 или 3 соответственно.

Настоящим документом также предусмотрен способ скрининга растений арбуза, семян, частей растения или ДНК из них на наличие мутантного аллеля гена, именуемого WAP5.1, или селекции растения, семян или части растения арбуза, содержащего мутантный аллель гена WAP5.1, включающий следующие этапы:

- a) анализ наличия в геномной ДНК аллеля WAP5.1 дикого типа, который кодирует белок SEQ ID NO: 1 или 9, и/или мутантного аллеля WAP5.1, который кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, замененных, вставленных или делетированных, по сравнению с белком WAP5.1 дикого типа и, при необходимости,
- b) селекцию растения, семени или части растения, содержащих две копии аллеля дикого типа, две копии мутантного аллеля или одну копию аллеля дикого типа и одну копию мутантного аллеля.

В одном аспекте способ по этапу a) включает в себя способ, выбранный из:

- i) амплификации, по меньшей мере, части аллеля WAP5.1 с использованием одного или более олигонуклеотидных праймеров, которые гибридизуются с ДНК аллеля WAP5.1,
- ii) гибридизации одного или более олигонуклеотидных зондов, по меньшей мере, с частью ДНК аллеля WAP5.1,
- iii) секвенирования ДНК, мРНК или кДНК аллеля WAP5.1.

Так, например, образец ДНК может быть получен из растения, семени или части растения, а также может быть выполнена реакция ПЦР для амплификации части аллеля WAP5.1 дикого типа и/или части мутантного аллеля WAP5.1. Например, можно использовать методы конкурентной ПЦР (такие как анализ KASP) для получения продуктов амплификации аллелей, присутствующих в локусе WAP5.1 в геномной ДНК. Аналогичным образом, олигонуклеотидные зонды могут генерировать продукты гибридизации аллелей, присутствующих в локусе WAP5.1 в геномной ДНК. Праймеры или зонды могут быть специфичными для конкретного аллеля WAP5.1, например, дифференцировать аллель дикого типа от мутантного аллеля. Например, SNP-маркер mwm23348429 содержит SNP в нуклеотиде 61, который отличает аллель дикого типа, кодирующий белок, который содержит аминокислоту L528, и мутантный аллель, кодирующий белок, который

содержит аминокислоту F528 в SEQ ID NO: 1 или 9. Праймеры или зонды могут быть предназначены обнаружения такого SNP, и то же самое можно сделать для любого другого полиморфизма (например, SNP или INDEL), обнаруженного между аллелями дикого типа и мутантными аллелями WAP5.1, такими как аллели, указанные в Таблице 1.

В одном аспекте предусмотрен анализ генотипирования для генотипирования растений, семян, частей растений, клеток или тканей арбуза, включающий следующие этапы:

- a) обеспечение наличия геномной ДНК одного или более растений арбуза или популяции растений, а также
- b) выполнение анализа генотипирования, который выявляет присутствие аллеля дикого типа, кодирующего белок SEQ ID NO: 1 или 9, и/или наличие мутантного аллеля, причем мутантный аллель кодирует мутантный белок, который содержит одну или более аминокислот, которые вставлены, делетированы или заменены применительно к SEQ ID NO: 1 или 9, и, при необходимости,
- c) селекцию растения, семени, части растения, клетки или ткани, содержащих две копии аллеля дикого типа либо одну копию аллеля дикого типа и одну копию мутантного аллеля, либо две копии мутантного аллеля.

На этапе b) мутация в мутантном аллеле предпочтительно обуславливает вставку, делецию или замену одной или более аминокислот по отношению к белку дикого типа, например, мутантный аллель кодирует один из мутантных белков WAP5.1, описанных в настоящем документе, например, в Таблице 1.

Аллели дикого типа представляют собой, например, геномную ДНК в локусе на хромосоме 5, соответствующем локусу Charleston Grey в описанной области, или локусу разновидности 97103 в описанной ранее области. Указанные локусы WAP5.1 содержат геномную последовательность SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 14, соответственно. Оба имеют идентичность последовательностей 99,8% при попарном выравнивании с использованием программы Needle. кДНК, кодируемая локусами дикого типа, представляет собой кДНК SEQ ID NO: 6 (кодирует белок дикого типа SEQ ID NO: 1) и, соответственно, кДНК SEQ ID NO: 11 (кодирует белок дикого типа SEQ ID NO: 9).

Этап а) может включать в себя выделение геномной ДНК из растения, семян, части растения, клетки или ткани для анализа в рамках генотипирования. Зачастую используются методы выделения ДНК, известные в данной области.

Этап б) предпочтительно включает в себя анализ биаллельного генотипирования, в котором используются аллель-специфические олигонуклеотидные праймеры и/или аллель-специфические зонды, т.е. праймеры или зонды, которые различают аллель дикого типа и мутантный аллель.

Растения этапа а) могут быть подвергнуты мутагенезу с использованием, например, химических или радиационных мутагенов или способов редактирования генов. Таким образом, этапу а) может предшествовать этап обработки растений, семян или частей растений мутагенным агентом или индуцирования целевых мутаций в аллеле WAP5.1.

Можно применять различные анализы на генотипирование, если они позволяют обнаруживать INDEL и SNP, а также различать аллель дикого типа, присутствующий в геномной ДНК (в локусе WAP5.1 на хромосоме 5), или мутантный аллель WAP5.1. ген, который присутствует в геномной ДНК. Анализ на генотипирование, как правило, основан на аллель-специфических праймерах, используемых в ПЦР или реакциях термоциклирования (полимеразная цепная реакция) для амплификации либо дикого типа, либо мутантного аллеля и обнаружения продукта амплификации, либо на аллель-специфических олигонуклеотидных зондах, которые гибридизуются либо с аллелем дикого типа, мутантным аллелем, или и с тем, и с другим. Например, при генотипировании с помощью зондов BnQplus используются два аллель-специфических зонда и два праймера, граничащих с областью полиморфизма, и во время термоциклирования полимеразы сталкивается с аллель-специфическими зондами, связанными с ДНК, и дает флуоресцентный сигнал. Дискриминация аллелей включает в себя конкурентное связывание двух аллель-специфических зондов BnQplus (см. также biosearchtech.com).

Примерами анализов на генотипирование являются анализы KASP (компания LGC, см. www.LGCgenomics.com, а также www.biosearchtech.com/products/pcr-kits-and-reagents/genotyping-assays/kasp-genotyping-chemistry), в основе которых лежит конкурентная аллель-

специфическая ПЦР и флуоресцентное обнаружение конечной точки, анализ TaqMan (Applied Biosystems), который также основан на ПЦР, анализ HRM (анализ плавления высокого разрешения), в котором аллель-специфические зонды обнаруживаются с помощью ПЦР в реальном времени, и Анализ rhAmp, основанный на РНКазе H2-зависимой ПЦР, генотипировании BHQplus, генотипировании BHQplex CoPrimer и ряд других.

KASP-анализ также описан в He C, Holme J, Anthony J. 'SNP genotyping: the KASP assay. *Methods Mol Biol.* 2014;1145:75-86' и EP1726664B1 или US7615620 B2, и включен в настоящий документ посредством отсылки. В рамках анализа путем генотипирования KASP используется уникальная форма конкурентной аллель-специфической ПЦР в сочетании с новой гомогенной системой отчетности на основе флуоресценции для идентификации и измерения генетической изменчивости, происходящей на уровне нуклеотидов, обнаружения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) или вставок и делеций (InDels). Технология KASP подходит для использования на различных платформах оборудования и обеспечивает гибкость в части количества SNP и количества анализируемых образцов. Химия KASP одинаково хорошо работает в форматах 96-, 384- и 1536-луночных титрационных микропланшетов и уже много лет используется в больших и малых лабораториях специалистами в области генетики человека, животных и растений.

Информация об анализе путем генотипирования TaqMan также описана в Woodward J. 'Bi-allelic SNP genotyping using the TaqMan® assay.' *Methods Mol Biol.* 2014;1145:67-74, US5210015 и US5487972, включена в настоящий документ посредством ссылки. В технологии TaqMan® используются аллель-специфические зонды для быстрого и надежного генотипирования известных полиморфных сайтов. Анализ TaqMan демонстрирует надежность при генотипировании нескольких типов вариантов, включая однонуклеотидные полиморфизмы, инсерции/делеции и варианты присутствия/отсутствия. Для исследования одного биаллельного полиморфизма два зонда TaqMan, помеченные разными флуорофорами, конструируют таким образом, чтобы они гибридизировались с разными аллелями во время ПЦР-амплификации окружающей области-мишени. Во время фазы удлинения праймера ПЦР 5'-3'-экзонуклеазная активность полимеразы Taq расщепляет и высвобождает флуорофоры из связанных зондов. В конце ПЦР

измеряется интенсивность излучения каждого флуорофора и выполняется определение аллеля в запрашиваемом сайте.

Следовательно, можно применять различные анализы генотипирования, которые позволяют различать наличие аллеля дикого типа гена WAP5.1, кодирующего белок SEQ ID NO: 1 или 9, или мутантного аллеля гена WAP5.1. Могут обнаруживаться различные мутантные аллели гена WAP5.1. Таким образом, не только мутантный аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10 (содержащий мутацию L528F), но и анализ может быть разработан для обнаружения любого другого мутантного аллеля гена WAP5.1, включая наименования описанные в Таблице 1 и т.д.

Как указывалось выше, предпочтительно выполняется анализ биаллельного генотипа, например, анализ KASP, анализ TaqMan, анализ BnQplus, генотипирование PACE (см. сеть Интернет, адрес idtdna.com/pages/products/qpcr-and-pcr/genotyping/pace-snp-genotyping-assays) или любое другое би-аллельное генотипирование.

В одном аспекте анализ на генотипирование на этапе b) описанных выше способов представляет собой анализ KASP. Таким образом, на этапе b) проводят конкурентную ПЦР с использованием двух прямых праймеров и одного общего обратного праймера. Два прямых праймера содержат, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов, комплементарных геномной последовательности (или ее комплементарной цепи). Кроме того, два прямых праймера содержат 1, 2, 3 или более нуклеотидов (предпочтительно на 3'-конце праймеров), которые обеспечивают специфичность к SNP или INDEL, которые отличают последовательность дикого типа от мутантной последовательности аллеля. Таким образом, два прямых праймера имеют различную специфичность (или предпочтение) связывания либо с аллелем дикого типа, либо с мутантным аллелем. Например, Fam-праймер может содержать, например, 17 нуклеотидов последовательности дикого типа и 1 нуклеотид, специфичный к нуклеотиду мутантного аллеля, а VIC-праймер может содержать 18 нуклеотидов аллеля дикого типа и 1 нуклеотид, специфичный по отношению к нуклеотиду аллеля дикого типа. KASP-анализ может быть без труда приспособлен для дифференциации аллеля дикого типа и любого мутантного аллеля гена WAP5.1, который отличается от аллеля дикого типа вставкой, делецией или заменой одного или более нуклеотидов,

т.е. анализ может быть разработан для любого SNP или INDEL, который предназначен для дифференциации двух аллелей.

Отмечено, что анализы на генотипирование, такие как анализ KASP, также можно проводить для обнаружения мутантного и/или аллеля WAP5.1 дикого типа в триплоидных или тетраплоидных растениях арбуза и частях растения таким же образом, как описано для диплоидных растений арбуза и частей растений.

В одном аспекте мутантный аллель гена WAP5.1 кодирует белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, замененных или делетированных по отношению к белку дикого типа SEQ ID NO: 1 или 9, как уже описано в других разделах настоящего документа.

Таким образом, в одном варианте осуществления предусмотрен способ обнаружения и, при необходимости, селекции растения, семян или части растения арбуза, содержащего, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена WAP5.1, включающий:

- a) обеспечение геномной ДНК растения арбуза или ряда растений (например, селекционная популяция, F2, обратное скрещивание и т.д.),
- b) выполнение анализа (например, биаллельного анализа генотипирования), который различает или позволяет различать наличие аллелей в геномной ДНК а), на основе амплификации нуклеиновых кислот (например, при этом указанный способ включает использование аллель-специфических олигонуклеотидных праймеров) и/или гибридизация нуклеиновых кислот (например, предусматривающая использование аллель-специфических олигонуклеотидных зондов) для обнаружения присутствия аллеля дикого типа гена и/или мутантного аллеля гена, причем аллель дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или 9 (или белок WAP5.1 дикого типа, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,8% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 1 или 9), и мутантный аллель кодирует белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, делетированных или замененных по отношению к белку дикого типа SEQ ID NO: 1 или 9 (или по отношению к белку WAP5.1 дикого типа, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,8% или 99,9% идентичен SEQ ID NO: 1 или 9), и, при необходимости,

- с) селекцию растения, семени или части растения, содержащих одну или две копии мутантного аллеля.

На этапе b) анализ на генотипирование позволяет различать аллели дикого типа и мутантные аллели на основе реакций амплификации нуклеиновых кислот (в частности, ДНК) с использованием, например, олигонуклеотидных праймеров, таких как ПЦР (полимеразная цепная реакция) и праймеры ПЦР, предпочтительно аллель-специфических праймеров, и/или гибридизация нуклеиновых кислот с использованием в качестве олигонуклеотидных зондов, предпочтительно аллель-специфических зондов.

Праймеры или зонды предпочтительно модифицируют с тем, чтобы они содержали метку, например, флуоресцентную метку или хвостовую последовательность или другую модификацию.

В одном аспекте в любом из вышеуказанных способов в рамках анализа используют один или более специфичных для аллеля WAP5.1 праймеров или один или более зондов, специфичных для аллеля WAP5.1. Как уже указывалось ранее, на основе геномной последовательности SEQ ID NO: 7 или 14 или других (например, выродженных) геномных последовательностей, которые кодируют белок SEQ ID NO: 1 или 9, или геномной последовательности мутантного аллеля, который кодирует, например, белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, делетированных или замененных, по сравнению с SEQ ID NO: 1 или 9, праймеры для ПЦР и зонды нуклеиновых кислот могут быть сконструированы с использованием известных способов или компьютерных программ для конструирования олигонуклеотидов. Праймеры и зонды могут, например, иметь длину не менее 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более нуклеотидов (оснований) и отжигаться до (или гибридизоваться с последовательностью матричной ДНК, т.е. они предпочтительно являются, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичными по границе с последовательностью-мишенью. Специфичность праймера или зонда к аллелю дикого типа или мутантному аллелю обусловлена тем, что, по меньшей мере, 1, 2, 3 или более нуклеотидов праймера или зонда являются специфичными для любого аллеля. Таким образом, праймеры или зонды конструируются вокруг полиморфизма (например, SNP или InDel) между двумя аллелями гена-мишени с тем, чтобы их можно было различать. В одном аспекте анализ представляет собой

анализ биаллельного генотипирования, выбранный, например, из группы, включающей в себя анализ KASP, анализ TaqMan, анализ зонда BnQplus или любой другой анализ биаллельного генотипирования.

В одном аспекте мутантный аллель содержит, по меньшей мере, один кодон, вставленный или дублированный в кодирующую область аллеля, или, по меньшей мере, один кодон, замененный другим кодоном (например, посредством замены одного нуклеотида), или, по меньшей мере, один кодон, удаленный или замененный на СТОП-кодон.

В любом из приведенных выше способов в одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, как описано в Таблице 1. Таким образом, в одном аспекте способы можно использовать для различения растений, семян или частей растения, содержащих две копии аллеля Wap5.1 дикого типа, кодирующего белок SEQ ID NO: 1 или 9, две копии мутантного аллеля WAP5.1, кодирующего мутантный белок из таблицы 1, или по одной копии каждого аллеля (гетерозиготные). При необходимости, растения, части растений или семена, содержащие любой из этих генотипов, могут быть выбраны, например, для дальнейшего разведения или использования в выращивании арбузов.

Несмотря на то, что в рамках вышеуказанных способов может использоваться любой ДНК-генотипический анализ, будь то на основе ПЦР (с использованием праймеров для ПЦР) и/или на основе гибридизации (с использованием зондов), в одном аспекте KASP-анализ используется для того, чтобы различать дикий тип и мутантный аллель. Анализ может выполняться в условиях высокой производительности, т.е. в планшетах с 96 и более лунками (например, в планшетах на 384 лунок).

В одном аспекте анализ позволяет различать SNP C/T в нуклеотиде 61 SEQ ID NO: 8. Таким образом, праймеры или зонды обнаруживают аллель, содержащий C или T в нуклеотиде 61 SEQ ID NO: 8.

В зависимости от SNP или INDEL для использования в рамках анализа между аллелем дикого типа и мутантным аллелем WAP5.1 можно разработать различные аллель-специфические праймеры и зонды.

В одном аспекте в KASP-анализе используют два прямых праймера (один для аллеля дикого типа и один для мутантного аллеля) и один общий обратный

праймер (как для аллеля дикого типа, так и для мутантного аллеля). В одном аспекте два прямых праймера и обратный праймер содержат, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или более нуклеотидов геномной последовательности WAP5.1 или ее комплементарной последовательности. Прямые праймеры дополнительно содержат, по меньшей мере, 1, 2 или 3 нуклеотида (предпочтительно на 3'-конце праймера), которые придают специфичность (или предпочтение) либо используются для амплификации аллеля дикого типа, либо амплификации мутантного аллеля. Каждый прямой праймер образует пару праймеров с общим обратным праймером для амплификации последовательности ДНК целевого аллеля между парой праймеров во время термоциклирования. Используются стандартные компоненты для термоциклирования и стандартные компоненты для KASP-анализа.

В другом варианте осуществления предусмотрен способ получения продукта гибридизации или продукта амплификации аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена WAP5.1, включающий:

- a) обеспечение геномной ДНК растения арбуза или ряда растений (например, селекционная популяция, F2, обратное скрещивание и т.д.),
- b) проведение анализа (например, биаллельного анализа генотипирования), который различает или может различать наличие аллелей в геномной ДНК а), при этом анализ позволяет получить продукт амплификации нуклеиновой кислоты (например, посредством использования праймеров аллель-специфического олигонуклеотида для получения продукта) и/или в котором анализ позволяет получить продукт гибридизации нуклеиновой кислоты (например, посредством использования аллель-специфических олигонуклеотидных зондов для получения продукта гибридизации), при этом продукт амплификации или продукт гибридизации указывает на присутствие аллеля дикого типа гена и/или мутантный аллель гена в ДНК, причем аллель дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или 9), а мутантный аллель кодирует белок, содержащий одну или более вставленных, дублированных, делетированных или замещенных аминокислот по отношению к белку дикого типа SEQ ID NO: 1 или 9), и, при необходимости,

- с) селекцию растения, семени или части растения, содержащих одну или две копии мутантного аллеля.

Также предусмотрен способ амплификации всего или части мутантного аллеля и/или аллеля WAP5.1 дикого типа из образца геномной ДНК, полученного из растения, части растения или семени арбуза, включающий приведение геномной ДНК в контакт с парой праймеров, которая амплифицирует весь или часть мутантного аллеля WAP5.1 или WAP5.1 дикого типа в образце, а также обнаружение продукта амплификации.

Также предусмотрен способ гибридизации зонда с мутантным аллелем и/или аллелем WAP5.1 дикого типа в образце геномной ДНК, полученным из растения, части растения или семени арбуза, включающий приведение в контакт геномной ДНК с олигонуклеотидным зондом, который гибридизуется с мутантным аллелем WAP5.1 или аллелем Wap5.1 дикого типа в образце, а также выявление продукта гибридизации.

Все варианты осуществления, описанные выше и в других разделах настоящего документа, также относятся к указанным вариантам осуществления. Таким образом, продукт амплификации может быть продуктом ПЦР-амплификации, например, конкурентный продукт амплификации ПЦР, полученный, например, в рамках анализа KASP или другого анализа для обнаружения мутантного и/или аллеля дикого типа в образце ДНК. Таким образом, продукт гибридизации может быть продуктом гибридизации олигонуклеотидного зонда, который гибридизуется с нуклеиновой кислотой в образце ДНК для обнаружения мутантного аллеля и/или аллеля дикого типа в образце ДНК. Пары праймеров или зонды предпочтительно являются аллель-специфичными, и, таким образом, продукты можно различить как представляющие собой две копии аллеля дикого типа, две копии мутантного аллеля или по одной копии каждого из присутствующих в геномной ДНК растения арбуза, растения часть или семени.

Праймеры или зонды предпочтительно модифицируют, например, помечая хвостовой последовательностью или флуоресцентной меткой или иным образом по отношению к последовательности дикого типа, которую они амплифицируют или гибридизуют.

Поскольку описанные способы требуют обнаружения мутантного аллеля и/или аллеля дикого типа в геномной ДНК растения, части растения или семени, геномная ДНК должна быть доступна для обнаружения, т.е. должна быть возможность ее выделить из растительных клеток с использованием методов выделения ДНК или, по меньшей мере, элюировать из поврежденных клеток в раствор (например, буферный раствор).

Поскольку в настоящем документе представлены гены-ортологи других Cucurbitaceae, вышеуказанные способы также могут быть применены к другим генам WAP5.1 и аллелям других видов, в частности, огурца и дыни.

Таким образом, в одном аспекте предусмотрен анализ генотипирования для генотипирования растений, семян, частей растений, клеток или тканей арбуза, огурца или дыни, включающий следующие этапы:

- a) обеспечение геномной ДНК одного или более растений арбуза, огурца или дыни или популяции растений (например, селекционной популяции, популяции F2, популяции обратного скрещивания и т.д.), а также
- b) проведение анализа генотипирования, который способен обнаруживать (или обнаруживает) присутствие аллеля дикого типа, кодирующего белок SEQ ID NO: 1 или 9 или белок, который, по меньшей мере, на 95% идентичен его последовательности (белок Wap5.1 дикого типа арбуза а) или SEQ ID NO: 2 или белок, который, по меньшей мере, на 95 % идентичен его последовательности (белок WAP5.1 дикого типа огурца) или SEQ ID NO: 3 или белок, который, по меньшей мере, на 95 % идентичен его последовательности (белок WAP5.1 дикого типа дыни) и/или наличие мутантного аллеля, причем мутантный аллель содержит одну или более аминокислот, вставленных, deletированных, замещенных или дублированных относительно SEQ ID NO: 1 или 9 (или в отношении последовательности дикого типа, которая, по меньшей мере, на 95% идентична ей), или SEQ ID NO: 2 (или в отношении последовательности дикого типа, которая, по меньшей мере, на 95% идентична ей), или SEQ ID NO: 3 (или в отношении

последовательности дикого типа, которая, по меньшей мере, на 95% идентична ей), а также, при необходимости,

- с) селекцию растения, семени, части растения, клетки или ткани, содержащих две копии аллеля дикого типа либо одну копию аллеля дикого типа и одну копию мутантного аллеля, либо две копии мутантного аллеля.

Таким образом, предусмотрен способ обнаружения и, при необходимости, селекции растения, семени или части растения арбуза, огурца или дыни, содержащего, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена *ClWAP5.1* (*Citrullus lanatus* WAP5.1), *CsWAP5.1* (*Cucumis sativus* WAP5.1) или *CmWAP5.1* (*Cucumis melo* WAP5.1), включающий:

- а) выполнение анализа образца геномной ДНК, полученного как минимум из одного растения, который обнаруживает или различает аллели WAP5.1 на основе амплификации нуклеиновых кислот и/или гибридизации нуклеиновых кислот для выявления присутствия аллеля дикого типа гена и /или мутантного аллеля гена, причем аллель дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или 9 или белок, который, по меньшей мере, на 95% идентичен ее последовательности (в арбузе), SEQ ID NO: 2 или белок, который, по меньшей мере, на 95% идентичен ее последовательности (в огурце) и SEQ ID NO: 3 или белок, который, по меньшей мере, на 95% идентичен ее последовательности (в дыне), а мутантный аллель содержит одну или более аминокислот, вставленных, делетированных или замещенных по отношению к SEQ ID NO: 1 или 9 (или по отношению к последовательности дикого типа, которая идентична ней, по меньшей мере, на 95%), SEQ ID NO: 2 (или последовательности дикого типа, которая идентична ней, по меньшей мере, на 95%) или SEQ ID NO: 3 (или последовательности дикого типа, которая идентична ней, по меньшей мере, на 95%), и, при необходимости,
- б) селекцию растения, семени или части растения, содержащих одну или две копии мутантного аллеля.

Кроме того, предусмотрен способ определения генотипа гена WAP5.1 и, при необходимости, селекции растения, семени или части растения арбуза, огурца или

дыни, содержащего определенный генотип, например, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена ClWAP5.1 (*Citrullus lanatus* WAP5.1), CsWAP5.1 (*Cucumis sativus* WAP5.1) или CmWAP5.1 (*Cucumis melo* WAP5.1), включающий:

- a) проведение анализа биаллельного генотипирования на одном или более образцах геномной ДНК, полученных из одного или более растений, причем данный анализ генотипирования позволяет выявить или выявляет аллели WAP5.1 на основе специфичных для аллелей WAP5.1 праймеров и/или WAP5.1 аллель-специфических зондов, при этом указанные аллель-специфические праймеры или аллель-специфические зонды обнаруживают присутствие аллеля дикого типа гена или мутантного аллеля гена, причем аллель дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или 9 или белок, который, по меньшей мере, на 95% идентичен ее последовательности (в арбузе), SEQ ID NO: 2 или белок, который, по меньшей мере, на 95% идентичен ее последовательности (в огурце) и SEQ ID NO: 3 или белок, который, по меньшей мере, на 95% идентичен ее последовательности (в дыне), а мутантный аллель содержит одну или более аминокислот, вставленных, deletированных или замещенных по отношению к SEQ ID NO: 1 или 9 (или по отношению к последовательности дикого типа, которая идентична ей, по меньшей мере, на 95%), SEQ ID NO: 2 (или последовательности дикого типа, которая идентична ей, по меньшей мере, на 95%) или SEQ ID NO: 3 (или последовательности дикого типа, которая идентична ей, по меньшей мере, на 95%), и, при необходимости,
- b) селекцию одного или более растений, семян или частей растения, содержащих одну или две копии мутантного аллеля.

Такой анализ можно проводить для маркерной селекции (MAS) растений, например, в рамках селекционной программы для селекции растений, содержащих определенный генотип, например, гомозиготные по аллелю дикого типа гена WAP5.1, гомозиготные или гетерозиготные по мутантному аллелю аллеля WAP5.1.

Таким образом, настоящим документом также предусмотрен способ селекции растений арбуза, огурца или дыни, включающий генотипирование одного

или более растений по аллельной композиции в локусе WAP5.1 в геноме и, при необходимости, селекция одного или более растений, имеющих определенный генотип в локусе WAP5.1. В одном аспекте также может быть выполнено генотипирование путем секвенирования гена WAP5.1.

Как уже указывалось выше, растения или семена, которые содержат две копии мутантного аллеля WAP5.1, могут, при необходимости, выращиваться и фенотипироваться для факультативной партенокарпии. Мутантный аллель в одном аспекте представляет собой мутантный аллель, который в гомозиготной форме придает факультативную партенокарпию.

В другом аспекте предусмотрено растение, семя или часть растения арбуза, огурца или дыни, содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена C1WAP5.1 в арбузе, CsWAP5.1 в огурце и CmWAP5.1 в дыне, причем мутантный аллель либо

- a) содержит одну или более мутаций в регуляторном элементе, приводящих к отсутствию или снижению экспрессии аллеля, по сравнению с аллелем дикого типа, и/или
- b) кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, заменных, вставленных или deletированных, по сравнению с белком дикого типа,

причем указанный мутантный аллель a) или b) придает факультативную партенокарпию, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме (по сравнению с растением, содержащим аллель дикого типа в гомозиготной форме), и причем аллель C1WAP5.1 арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или 9 или белок, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичен последовательности SEQ ID NO: 1 или 9, причем аллель огурца CsWAP5.1 дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 2 или белок, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичен последовательности SEQ ID NO: 2, причем аллель дикого типа дыни CmWAP5.1 кодирует белок SEQ ID NO: 3 или белок, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичен последовательности SEQ ID NO: 3.

Способы разведения

Кроме того, предусмотрен способ скрещивания растения, содержащего, по меньшей мере, один мутантный аллель WAP5.1, как указано в настоящем

документе, с растением, в котором, например, отсутствует мутантный аллель WAP5.1, и селекцию потомства, содержащего, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля WAP5.1.

Таким образом, в одном аспекте предусмотрен способ получения растения арбуза, огурца или дыни, включающий следующие этапы:

- a) получение растения арбуза, огурца или дыни, содержащего, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля WAP5.1, как указано выше;
- b) скрещивание указанного растения арбуза, огурца или дыни с другим растением арбуза, огурца или дыни для получения семян F1;
- c) при необходимости, самоопыление растения арбуза, выращенного из семян F1 один или более раз, для получения самоопыляющегося потомства F2, F3 или следующего поколения;
- d) скрещивание указанного самоопыляющегося потомства F1 или следующего поколения с растением, полученным на этапе b), для получения потомства обратного скрещивания;
- e) селекцию потомства обратного скрещивания, которое содержит мутантный аллель WAP5.1 этапа a).

При необходимости, растение с этапа e) содержит две копии мутантного аллеля WAP5.1 и является факультативным партенокарпиком.

Селекцию или обнаружение присутствия мутантного аллеля WAP5.1 на любом из этапов можно, при необходимости, проводить с применением молекулярных методов, таких как генотипирование SNP или INDEL, секвенирование и т.п.

Предпочтительно аллель на этапе a) представляет собой мутантный аллель, который обеспечивает факультативную партенокарпию в гомозиготной форме. В одном аспекте растение на этапе a) представляет собой растение арбуза, содержащее мутантный аллель из таблицы 1 либо в гетерозиготной, либо в гомозиготной форме.

Также предусмотрен способ получения растения арбуза, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений арбуза или создания популяции мутагенизированных растений арбуза, например, TILLING-популяции поколения M2, M3 или последующих поколений,
- b) выявление растения, которое имеет мутацию в аллеле, кодирующем белок WAP5.1, причем аллель дикого типа гена кодирует белок WAP5.1, который, по меньшей мере, на 95% идентичен по цепочке белку SEQ ID NO 1 или SEQ ID NO 9.

Способ может дополнительно включать один или оба этапа

селекцию растения, содержащего, по меньшей мере, две копии мутантного аллеля этапа b),

определение, дает ли растение плоды в отсутствие опыления.

Кроме того, настоящим документом предусмотрены любые последовательности и молекулы последовательностей, а также последовательности, которые, по меньшей мере, на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичны последовательности с предоставленными последовательностями. Также предусмотрены фрагменты и/или модифицированные последовательности (например, праймеры или зонды, содержащие не менее 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов последовательности или последовательности комплемента) и их использование в разведении (например, MAS) или выявлении или селекции растений или частей растений.

При описании мутантного белка становится очевидно, что настоящим документом предусмотрена геномная последовательность и последовательность мРНК или кДНК, кодирующая мутацию, приводящую к мутации в белке, а также они могут использоваться для обнаружения аллеля в геноме, содержащего мутацию, приводящую к смене аминокислоты и, например, может проводиться анализ генотипирования, направленный на мутантный аллель.

Описание последовательностей

SEQ ID NO: 1: белок WAP5.1 дикого типа арбуза.

SEQ ID NO: 2: белок WAP5.1 дикого типа огурца.

SEQ ID NO: 3: белок WAP5.1 дикого типа дыни.

- SEQ ID NO: 4: мутантный белок WAP5.1 арбуза, причем аминокислота L (Лейцин) 528 заменена F (Фенилаланином).
- SEQ ID NO: 5: кДНК, кодирующая мутантный белок WAP5.1 SEQ ID NO: 4.
- SEQ ID NO: 6: кДНК, кодирующая белок WAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 1.
- SEQ ID NO: 7: геномная ДНК, кодирующая белок WAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 1.
- SEQ ID NO: 8: SNP маркер (mwm23348429) на нуклеотиде 61 (С/Т) для обнаружения мутантного аллеля war5.1 или аллеля War5.1 дикого типа. В аллеле дикого типа кодон СТТ кодирует лейцин, L528 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или L535 SEQ ID NO: 2 или L538 SEQ ID NO: 3. В мутантном аллеле С заменен на Т (С→Т), и полученный мутантный кодон ТТТ кодирует F, фенилаланин, вместо L, лейцина. Таким образом, SNP-маркер содержит Т в нуклеотиде 61 SEQ ID NO: 8 или в последовательности, которая, по меньшей мере, на 92%, 93%, 94%, 95% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8, можно использовать для обнаружения мутантного аллеля war5.1, в то время, как SNP-маркер, содержащий С в нуклеотиде 61 SEQ ID NO: 8, или последовательности, которая, по меньшей мере, на 92%, 93%, 94%, 95% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 8, может использоваться для обнаружения аллеля War5.1 дикого типа.
- SEQ ID NO: 9: последовательность белка War5.1 дикого типа арбуза типа линии ТУ арбуза; обратите внимание, что аминокислота 51 представляет собой R (Arg).
- SEQ ID NO: 10: мутантный арбузный белок WAP5.1, присутствующий в линии ТУ, в котором аминокислота L (лейцин) 528 заменена на F (фенилаланин).
- SEQ ID NO: 11: кДНК, кодирующая белок дикого типа SEQ ID NO: 9.
- SEQ ID NO: 12: кДНК, кодирующая мутантный белок SEQ ID NO: 10.
- SEQ ID NO: 13: домен F-бокс.
- SEQ ID NO: 14: геномная ДНК, кодирующая белок дикого типа SEQ ID NO: 9.

Примеры

Мутантная популяция арбуза (полученная с помощью EMS-обработки элитной линии, называемой TY) была проверена с помощью метода прямого скрининга в Чили, и был обнаружен один мутант, который давал плоды без опыления в защищенной от насекомых теплице.

Одно растение, способное давать партенокарпические плоды, было отобрано и использовано для создания нескольких картирующих популяций F2 с разным генетическим фоном. В одной популяции QTL был картирован в районе 0,47 Мб/8,2 сМ на хромосоме 5. В этом интервале присутствовали две мутации: первая мутация находилась в межгенной области, а вторая мутация заменяла высококонсервативную аминокислоту лейцина (L) в фенилаланин (L528F) в указанном по тексту настоящего документа гене *war5.1*.

Было установлено, что данный мутантный аллель *war5.1* полностью уникален для данной линии, когда его сравнили с 93 линиями с повторным секвенированием всего генома.

Маркеры, насыщающие интервал хромосомы 5, были разработаны и использованы в популяции F2. Маркер *mWM23348429* с наибольшей ассоциацией с признаком был разработан для несинонимичной мутации в гене *war5.1*. Для того, чтобы подтвердить указанную мутацию, дополнительные 92 растения F2 были генотипированы с использованием *mWM23348429* и фланкирующих маркеров. Наиболее высоким связанным маркером был *mWM23348429*, что дополнительно подтвердило, что мутация, для которой был разработан этот маркер, лежала в основе признака.

Ген *war5.1* является единственным рецессивным геном, а факультативный партенокарпический фенотип сегрегирован вместе с мутантным аллелем *war5.1* у растений, которые являются гомозиготными по мутации (*war5.1/war5.1*).

Прогнозирование контактов с использованием RaptorX было выполнено для белков *War5.1* дикого типа и мутантных белков и продемонстрировало, что мутация L528F приводит к некорректной трехмерной укладке белка LRR-домена, по сравнению с белком дикого типа, что, скорее всего, существенно снижает нормальную белковую функцию *in vivo* или даже приводит к полному отсутствию нормальной функции *in vivo*. LRR-домен, вероятнее всего, участвует в белок-

белковых взаимодействиях, соответственно небольшое структурное изменение этого высокоупорядоченного и высококонсервативного белкового домена может оказывать существенное влияние на функцию.

Ортологи гена WAP5.1 были выявлены с помощью анализа BLAST. Белки огурца и дыни содержали домен F-box, который был идентичен у всех трех видов Cucurbitaceae. Кроме того, LRR-домен являлся высококонсервативным. Было установлено, что большая часть аминокислотных вариаций находится в N-концевых частях белка, которые предшествуют домену F-бокс.

Дополнительные мутанты гена *wap5.1* были выявлены в мутантной популяции арбуза (см. таблицу 1) и будут проверены на фенотип в растениях, которые являются гомозиготными по мутантному аллелю.

Кроме того, при рассмотрении геномной последовательности гена WAP5.1, в фоновой линии арбуза дикого типа TY и мутантной линии *wap5.1* (полученной на фоне TY), было обнаружено, что аминокислота в положении 51 представляет собой R (Arg; аргинин, кодон CGT в нуклеотидах со 151 по 153, SEQ ID NO: 11 и 12), а не G (Gly; глицин, кодон GGT в нуклеотидах со 151 по 153 SEQ ID NO:6), который находится в эталонном геноме Charleston Grey. R51 обнаружен как в белке WAP5.1 дикого типа линии TY, так и в мутантном белке *wap5.1* (содержащем замену L528F). Тот же самый R51 также обнаружен в белке WAP5.1 дикого типа генома арбуза 97103, как описано выше.

Также в линии TY S450 (серин 450) кодируется кодоном AGC в нуклеотидах с 1348 по 1350 SEQ ID NO: 11 и 12, в то время как в эталонном геноме Charleston Grey S450 кодируется кодоном AGT в нуклеотидах с 1348 по 1350 SEQ ID NO: 6. По тексту настоящего документа белок WAP5.1 дикого типа линии TY представлен в виде SEQ ID NO: 9, а кДНК, кодирующая белок WAP5.1 дикого типа линии TY, представлена в настоящем документе в виде SEQ ID NO: 11. кДНК идентична кДНК разновидности 97103 V2, встречающейся в базе данных cucurbitgenomics.org. Геномная последовательность SEQ ID NO: 14, кодирующая белок WAP5.1 дикого типа, получена из базы данных сорта арбуза 97103 V2.

Мутантный белок *wap5.1*, обнаруженный в мутантной популяции TY и содержащий аминокислотную замену L528F, представлен в настоящем документе

в SEQ ID NO: 10. Аналогичным образом, кДНК, кодирующая указанный мутантный белок, представлена в SEQ ID NO: 12.

Белок WAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 1 (геном Charleston Grey) и белок WAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 9 (линия TY и геном арбуза 97103) являются на 99,9 % идентичными по последовательности друг другу при попарном выравнивании, так как различие состоит только в одной аминокислоте.

кДНК, кодирующая белок WAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 1 (геном Charleston Grey), и кДНК, кодирующая белок WAP5.1 дикого типа SEQ ID NO: 9 (линия TY), также являются на 99,9% идентичными по последовательности, при этом два нуклеотида различаются.

Растения арбуза, гомозиготные по мутантному аллелю *wap5.1* (содержащему замену L528F), характеризовались нормальным ростом и морфологией. Никаких отклонений в росте и развитии растений не наблюдалось. Единственное фенотипическое различие, которое можно было наблюдать у гомозиготных по мутантному аллелю *wap5.1* растений заключалась в том, что зрелые плоды, полученные в отсутствие опыления, имели слегка треугольную форму на одном конце, см. Фиг. 5. Тем не менее, непонятно, является ли это эффектом мутации или фоновым эффектом.

Формула изобретения

1. Растение или часть растения арбуза, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля эндогенного гена WAP5.1, расположенного на хромосоме 5, причем указанный мутантный аллель либо

- a) содержит одну или более мутаций в регуляторном элементе, приводящих к отсутствию или снижению экспрессии аллеля, по сравнению с аллелем дикого типа, либо
- b) кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, замененных, вставленных или делетированных, по сравнению с белком дикого типа,

причем указанный мутантный аллель а) или б) придает факультативную партенокарпию, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, при этом аллель WAP5.1 дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 9.

2. Растение или часть растения арбуза по п. 1, причем указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, делетированных или замененных в F-бокc-домене белка, начиная с аминокислоты 237 и заканчивая аминокислотой 277 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9.

3. Растение или часть растения арбуза по п. 1, причем указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, делетированных или замененных в LRR-домене белка, начиная с аминокислоты 291 и заканчивая аминокислотой 1033 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, причем указанная вставка, делеция или замена приводит к неправильной укладке LRR-домена белка.

4. Растение или часть растения арбуза по любому из предшествующих пунктов, причем указанный мутантный аллель содержит мутацию в кодоне, кодирующем аминокислоту номер D209, A257, A266, W274, E287, Q333, L528, P308 или G330 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9.

5. Растение или часть растения арбуза по любому из предшествующих пунктов, причем указанный мутантный аллель кодирует аминокислотную замену или стоп-кодон аминокислоты номер D209, A257, A266, W274, E287, Q333, L528, P308 или G330 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9.

6. Растение или часть растения арбуза по любому из предшествующих пунктов, причем указанный мутантный аллель кодирует одну или более следующих аминокислотных замен: D209V, A257V, A266V, W274STOP, E287K, Q333STOP, L528F, P308L или G330E SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9.

7. Растение или часть растения арбуза по любому из предшествующих пунктов, причем указанное растение или часть растения являются диплоидными и гомозиготными по мутантному аллелю.

8. Растение или часть растения по любому из пп. 1 - 7, причем растение арбуза является диплоидным, триплоидным или тетраплоидным.

9. Растение или часть растения по п. 8, причем диплоидное растение или часть растения содержат две копии, триплоидное растение или часть растения содержат одну, две или три копии, а тетраплоидное растение или часть растения содержат две или четыре копии мутантного аллеля.

10. Семя, из которого могут быть выращены растение или часть растения по любому из предшествующих пунктов.

11. Плод, полученный от растения по любому из предшествующих пунктов, при необходимости, причем плод является бессемянным и получен в отсутствие опыления.

12. Растение или часть растения по любому из пп. 1 - 9, причем указанное растение или часть растения дополнительно содержат ген, придающий мужское бесплодие, или ген, придающий стеноспермокарпию, или другой ген, придающий партенокарпию.

13. Часть растения по любому из предшествующих пунктов, причем часть растения представляет собой клетку, цветок, лист, стебель, черенок, семяпочку, пыльцу, корень, подвой, отросток, плод, протопласт, зародыш, пыльник.

14. Вегетативно размножающееся растение, полученное из части растения по п. 13.

15. Способ получения бессемянных плодов арбуза, при этом указанный способ включает выращивание диплоидного растения арбуза, содержащего две копии мутантного аллеля по любому из пп. 1 - 6, в результате чего предотвращается опыление цветков во время выращивания и сбора бессемянных плодов, которые получают из неопыленных цветков.

16. Способ получения бессемянных плодов арбуза, при этом указанный способ включает выращивание триплоидного растения арбуза, содержащего одну, две или три копии мутантного аллеля по любому из пп. 1 - 6, в результате чего во время выращивания и сбора урожая бессемянных плодов, которые получают из неопыленных цветков, растение-опылитель отсутствует.

17. Способ скрининга растений арбуза, семян, частей растения или их ДНК на наличие мутантного аллеля гена WAP5.1 или селекции растения, семени или части растения арбуза, содержащих мутантный аллель гена, известного как WAP5.1, включающий следующие этапы:

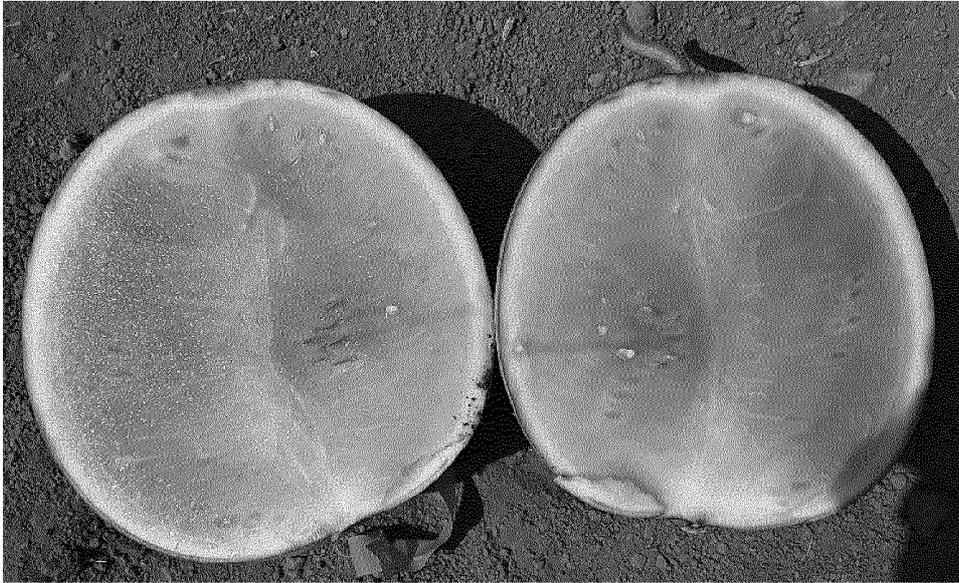
- a) анализ наличия в геномной ДНК аллеля WAP5.1 дикого типа, который кодирует белок SEQ ID NO: 1 или 9, или белка, который, по меньшей мере, на 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, и/или мутантного аллеля WAP5.1, который кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, замененных, вставленных или делегированных, по сравнению с белком WAP5.1 дикого типа и, при необходимости,
- b) селекцию растения, семени или части растения, содержащих две копии аллеля дикого типа, две копии мутантного аллеля или одну копию аллеля дикого типа и одну копию мутантного аллеля.

18. Способ по п. 17, причем этап а) включает способ, выбранный из:

- i) амплификации, по меньшей мере, части аллеля WAP5.1 с использованием одного или более олигонуклеотидных праймеров, которые гибридизуются с ДНК аллеля WAP5.1,

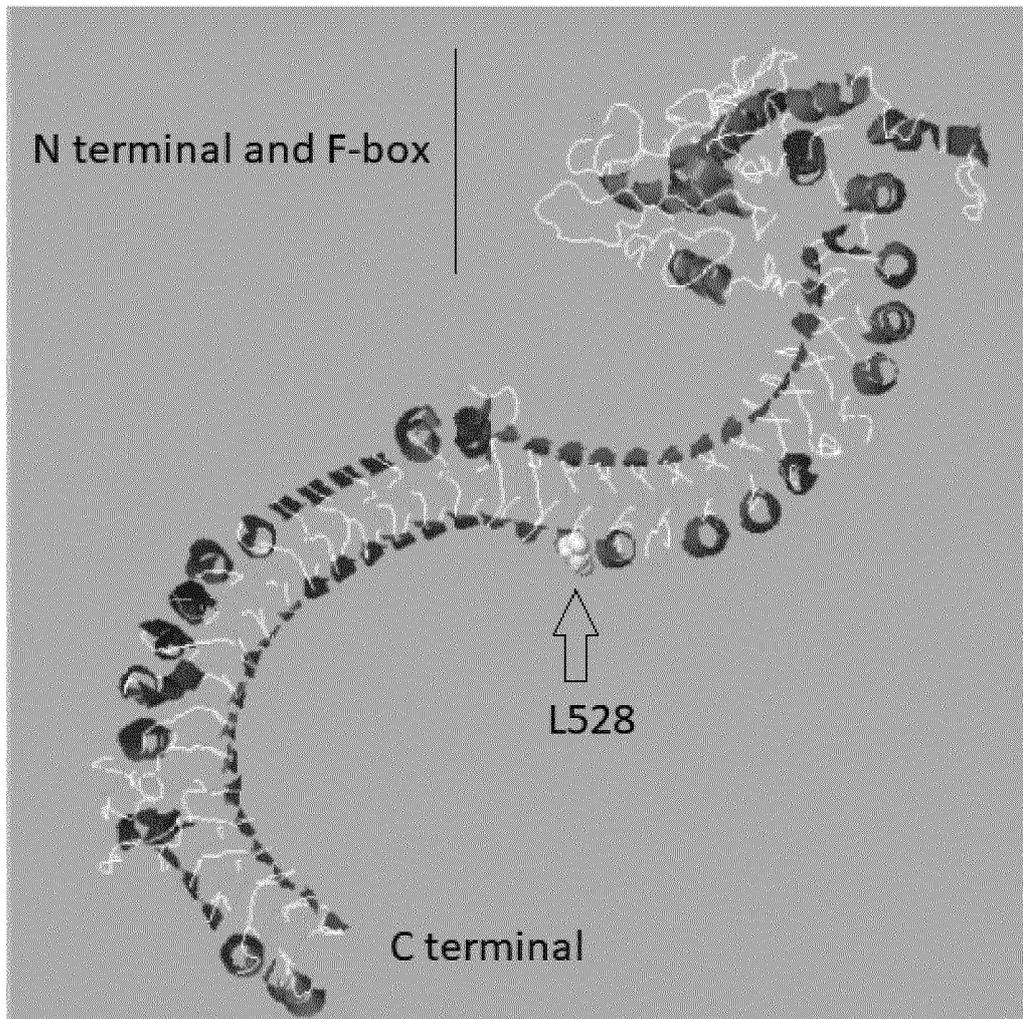
- ii) гибридизации одного или более олигонуклеотидных зондов, по меньшей мере, с частью ДНК аллеля WAP5.1,
- iii) секвенирования ДНК, мРНК или кДНК аллеля WAP5.1.

Фигура 1

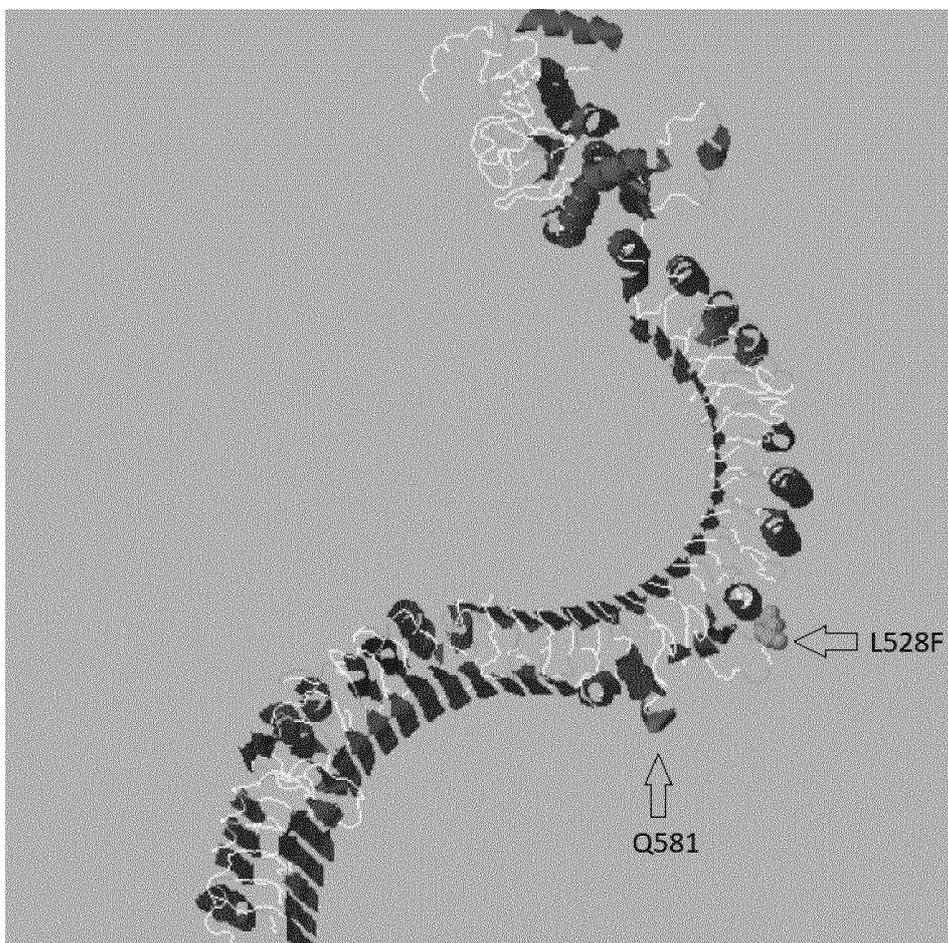


wap5.1	601	DCESLTNSICEVFSDDGGGCPMLKSLVLDNCESLTAVRFCSSSLGSLSLVG	650
wt	651	CRAITSLELQCPNLEQVSLDGDHLEASFSFVGLRSLNLGICPKLNELK	700
wap5.1	651	CRAITSLELQCPNLEQVSLDGDHLEASFSFVGLRSLNLGICPKLNELK	700
wt	701	LEAPRMDLLELKGCGGLSEAAINCPRLTSLDASFCGQLKDECLSATTASC	750
wap5.1	701	LEAPRMDLLELKGCGGLSEAAINCPRLTSLDASFCGQLKDECLSATTASC	750
wt	751	PQIESLIILMSCPSVSGEGLYSLRCLLKLVLVLDLSYTFMLSLQPVFESCIQ	800
wap5.1	751	PQIESLIILMSCPSVSGEGLYSLRCLLKLVLVLDLSYTFMLSLQPVFESCIQ	800
wt	801	LKVLKLQACKYLTDSSEPLYKEDALPALQELDLSYGTLCQSAIEELLAC	850
wap5.1	801	LKVLKLQACKYLTDSSEPLYKEDALPALQELDLSYGTLCQSAIEELLAC	850
wt	851	CTHLTHVSLNGCVNMHDLNWGCSIGQLSLSSIPIPLGQATLDEIEEPVAQ	900
wap5.1	851	CTHLTHVSLNGCVNMHDLNWGCSIGQLSLSSIPIPLGQATLDEIEEPVAQ	900
wt	901	PNRLLQNLNLCVGCQNIRKVLIPPAARCFHLSSLNLSLSSNLKEVDVSCYN	950
wap5.1	901	PNRLLQNLNLCVGCQNIRKVLIPPAARCFHLSSLNLSLSSNLKEVDVSCYN	950
wt	951	LCFLNLSNCCSLEVLKLDLCPRLTSLFLQSCNIEEEVVVAVSRCSMLETL	1000
wap5.1	951	LCFLNLSNCCSLEVLKLDLCPRLTSLFLQSCNIEEEVVVAVSRCSMLETL	1000
wt	1001	DVRLCPKISSISMVQLRIACPSLKRIFFSTLSPT 1033	
wap5.1	1001	DVRLCPKISSISMVQLRIACPSLKRIFFSTLSPT 1033	

Фигура 3 А



Фигура 3 В



Фигура 4

<p>вар5.1 дыня огурец</p>	<p>MTIWCCLCFTVG---EEDEREREEELKK-EGEMKPMREEVFENQDDSDRIVRNGDDSQ MTIWCCLCFTVGEDEDEREREEVKKKEEGEMKPMREEVFENQDDSDRIVRNGDDSQ MTIWCCLCFTVG-EDEDERAREEEVKKKEEGEMKPMREEVFENQDDSDRIVRNGDDSQ *****</p>
<p>вар5.1 дыня огурец</p>	<p>GSNPLPIAVDDAPDRHDGDRRLRFEDMVRAMHDGADGGG-AHWDELRRGG--GGGAINPW GSNPLASAVDDVPERHGSQDLRLRFEDMVRAMHDGGDGGGAHCHWDELRRGGGAGGGVINPW GSNPLASAVDDVPERHGDRLRFEDMVRAMHDGGDGG--AHWDELRRGAGAGGGAINPW *****</p>
<p>вар5.1 дыня огурец</p>	<p>NFSFGILHQSEGGESSASALSSTVETSNEERDRDANHKRAKVLSKFTESSFATPWPL NLSFGIMHQSEGGESSASALPLSSMAETSIEERDRDAHKKRAKVHVKFIESSFATPWPL NLSFGIMHQSEGGESSASALPLSMVETSMEERDRDAHKKRAKVHVKFIESSFATPWPL *:*</p>
<p>вар5.1 дыня огурец</p>	<p>GAGNPMRDYDFIHGSSSIMSRNEFLYHASTSCRV--DEDLESSFGRDDGINENDTCKSEG GAGNPMREFDFIHGSSSIMSRNEFLYHASTSSRIDADKDESSFGRDDGINENDTCKSEG GAGNPMREYDFIHGSPSIMSRNEFLYHASTSSRFADKDESSFGRDDGINENDTCKSEG *****</p>
<p>вар5.1 дыня огурец</p>	<p>FEVRMDLTDLLHMVFSFLDHINLCRAAIVCRQWQAASAHEDFWRCIN FENRNI SMEQFE FEVRMDLTDLLHMVFSFLDHINLCRAAIVCRQWQAASAHEDFWRCIN FENRNI SMEQFE FEVRMDLTDLLHMVFSFLDHINLCRAAIVCRQWQAASAHEDFWRCIN FENKNI SMEQFE *****</p>
<p>вар5.1 дыня огурец</p>	<p>DMCGRYPNATEVNI SGVPAVHLLAMKAVSSLRHLEVLTLGRGQLADNFFHALTDCHLLKS DMCGRYPNATEVNI SGVPAVHLLAMKAVSSLRNLEVLTLGRGQLADNFFHALADCHLLKS DMCGRYPNATEVNI SGVPAVHLLAMKAVSSLRNLEVLTLGRGQLADNFFHALADCHLLKS *****</p>
<p>вар5.1 дыня огурец</p>	<p>LTVNDSTLVNVTQEIPI SHDRLRHLHLTKCRVIRISVRCPQLETLSLKRSNMAQAVLNCP LTVNDSTLVNVTQEIPI SHDRLRHLHLTKCRVIRISVRCPQLETLSLKRSNMAQAVLNCP LTVNDSTLVNVTQEIPI SHDGLRHLHLTKCRVIRISVRCPQLETLSLKRSNMAQAVLNCP *****</p>
<p>вар5.1 дыня огурец</p>	<p>LLRDLDIGSCHKLSDAAIRSAAISCPQLESLDMSNCSCVSDETLREISANCPNLQLLNAS LLRDLDIGSCHKLSDAAIRSAAISCPQLESLDMSNCSCVSDETLREISGSCPNLQLLNAS LLRDLDIGSCHKLSDAAIRSAAISCPQLESLDMSNCSCVSDETLREISGSCPNLQLLNAS *****</p>
<p>вар5.1 дыня огурец</p>	<p>YCPNISLESVRLTMLTVLKLHSCGITSASMTAISSSSLKVLELDNCSLLTSVSLDLPH YCPNISLESVRLTMLTVLKLHSCGITSASMTAISNSSSLKVLELDNCSLLTSVCLDLPH YCPNISLESVRLTMLTVLKLHSCGITSASMTAISNSSSLKVLELDNCSLLTSVCLDLPD *****</p>
<p>вар5.1 дыня огурец</p>	<p>LQNI RLVHCRKFSDSLQSVKLSSIMVSNCPSLHRINITSNLLQKLVLKKQESLAKLVLQ LQNI RLVHCRKFSDSLQSVKLSSIMVSNCPSLHRINITSNLLQKLVLKKQESLAKLVLQ LQNI RLVHCRKFSDSLQSIKLSIMVSNCPSLHRINITSNLLQKLVLKKQESLAKLILQ *****</p>
<p>вар5.1 дыня огурец</p>	<p>CPSLQDVDLTDCESLTNSICEVFSDDGGCPMLKSLVLDNCESLTAVRFCSSSLGSLSLVG CPSLQDVDLTDCESLTNSICEVFSDDGGCPMLKSLVLDNCESLTAVRFCSSSLGSLSLVG CPSLQDVDLTDCESLTNSLCEVFSDDGGCPMLKSLVLDNCESLTAVRFCSSSLGSLSLVG</p>

*****:*****

war5.1
дыня
огурец

CRAITSLELQCPNLEQVSLDGDHLERASFSPVGLRSLNLGICPKLNELKLEAPRMDLLE
CRAITSLELQCPNLEQVSLDGDHLERASFSPVGLRSLNLGICPKLNELKLEAPRMDLLE
CRAITSLELQCPNLEKVS LDGCDRLERASFSPVGLRSLNLGICPKLNELKLEAPHMDLLE
*****:*****

war5.1
дыня
огурец

LKGCGLSEAAINCPRLTSLDASFCGQKDECLSATTASCPQIESLIIMSCPSVGSEGLY
LKGCGLSEAAINCPRLTSLDASFCGQKDECLSATTASCPQIESLIIMSCPSVGSEGLY
LKGCGLSEAAINCPRLTSLDASFCGQKDECLSATTASCPQIESLIIMSCPSVGSEGLY
*****:*****

war5.1
дыня
огурец

SLRCLLKLVVLDLSYTFMLNLQPVFESCIQLKVLKLQACKYLTDSSLEPLYKEDALPALQ
SLRCLLKLVVLDLSYTFMLNLQPVFESCIQLKVLKLQACKYLTDSSLEPLYKEGALPALQ
SLQCLLKLVVLDLSYTFMLNLQPVFESCIQLKVLKLQACKYLTDSSLEPLYKEGALPALQ
** *****:*****

war5.1
дыня
огурец

ELDLSYGTLCQSAIEELLACCTHLTHVSLNGCVNMHDLNWGCSIGQLSLSIPIPLGQAT
ELDLSYGTLCQSAIEELLACCTHLTHVSLNGCVNMHDLNWGCSIGQLSLSVIPIPLGQAT
ELDLSYGTLCQSAIEELLACCTHLTHVSLNGCVNMHDLNWGCSIGQLSLSGIPIPLGQAT

war5.1
дыня
огурец

LDEIEEPVAQPNRLLQNLNCVGCQNIIRKVLIPPAARCFHLSSLNLSLSSLNLKEVDVSCYN
FDEIEEPVAQPNRLLQNLNCVGCQNIIRKVLIPPAARCFHLSSLNLSLSSLNLKEVDVSCYN
FDEIEEPIAQPNRLLQNLNCVGCQNIIRKVLIPPAARCFHLSSLNLSLSSLNLKEVDVSCYN
:*****:*****

war5.1
дыня
огурец

LCFLNLSNCCSLEVLKLDLCPRLTSLFLQSCNIEEEVVVAAVSRCSMLETLDVRLCPKISS
LCFLNLSNCCSLEVLKLDLCPRLTSLFLQSCNIEEEVVVAAVSKCSMLETLDVRFPCPKISS
LCVFNLSNCCSLEVLKLDLCPRLTNLFLQSCNIEEEVVVAAVSKCSMLETLDVRFPCPKISS
** *****:*****

war5.1
дыня
огурец

ISMVQLRIACPSLKRIFFSTLSPT
ISMVQLRIACPSLKRIFFSSLSP
ISMVQLRIACPSLKRIFFSSLSP
*****:*****

Фигура 5

