

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391364 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.22

(22) Дата подачи заявки
2021.11.02

(51) Int. Cl. *A01H 1/02* (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)
A01H 6/34 (2018.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A01H 5/08 (2018.01)

(54) ПАРТЕНОКАРПИЧЕСКИЕ РАСТЕНИЯ АРБУЗА

(31) 20206517.3; 63/111,941; 63/117,791

(32) 2020.11.09; 2020.11.10; 2020.11.24

(33) EP; US; US

(86) PCT/EP2021/080366

(87) WO 2022/096451 2022.05.12

(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, дающим бессемянные плоды. Настоящее изобретение также относится к способам получения указанных растений и способам получения бессемянных плодов арбуза.

202391364 A1

202391364

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 WAP7.1. 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 *wap7.1*, 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 ($3x$), 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 триптофанмоно-оксигеназы (*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 (Acciari 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 дают плоды с семенами, и такие растения могут размножаться независимо друг от друга путем самоопыления.

Бессемянный виноград может быть получен как из партенокарпических, так и стеноспермокарпических сортов. Сорт Black Corinth является партенокарпическим, тогда как Sultanina является стеноспермокарпическим. 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 пыльцой растений с мужской фертильностью. Поэтому арбуз MFS можно классифицировать как стеноспермокарпический. Семязачатки также были практически полностью нежизнеспособными, так как при перекрестном опылении мутантов MFS пыльцой 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 стеноспермокарпических культур, таких как триплоидные ($3n$) растения арбуза, необходимо опылить женскую часть цветка растения. Стеноспермокарпические 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 происходит 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 WAP7.1, приводит к тому, что в растениях арбуза развиваются 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 WAP7.1 отвечает за факультативную партенокарпию у арбуза. Таким образом, когда мутантный аллель *wap7.1* присутствует в гомозиготной форме в диплоидном растении арбуза, что в настоящем документе обозначается как *wap7.1/wap7.1*, 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 WAP7.1 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 *WAP7.1* 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 WAP7.1, а мутантный аллель – *wap7.1*.

Несколько картирующих популяций F2 были созданы с разным генетическим фоном из одной линии растений, способных давать партенокарпические плоды. Были фенотипированы и генотипированы две популяции F2, полученные из двух разных фонов. QTL был картирован в области размером 5,6 млн п.н. на хромосоме 7, которая содержала 16 мутаций, 15 из которых находились в межгенных областях, а одна мутация (одна нуклеотидная замена) находилась в гене, представленном в настоящем документе в SEQ ID NO: 6 (дикий тип, содержащий G в нуклеотиде 7394) и SEQ ID NO: 7 (мутант, содержащий A в нуклеотиде 7394), заменяющая кодон, кодирующий W1054 (кодон TGG), на STOP-кодон (кодон TGA) и, таким образом, усекая кодируемый белок. На Фиг. 2 представлены аминокислотные последовательности аллеля дикого типа и мутантного белка WAP7.1 SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно. Таким образом, в мутантном белке W1054* (также именуемом W1054STOP) отсутствуют аминокислоты 1054 – 1266, то есть до конца белка.

В эталонном геноме арбуза ген дикого типа находится на хромосоме 7, т.е. в геноме Чарльстон Грей, обнаруженном в базе данных на cucurbitgenomics.org, при этом

ген WAP7.1 обозначен C1CG07G008850.1 и находится на плюс-нити, начинающейся с нуклеотида 23357225 (ATG) и заканчивающейся нуклеотидом 23365257 (TGA). Точно так же в эталонном геноме сорта 97103 (геном 97103 V2) ген дикого типа, обозначенный как Cla97C07G135900.1, находится на хромосоме 7, начиная с нуклеотида 21927587 и заканчивая нуклеотидом 21935619. Утверждается, что оба гена кодируют «белок, содержащий домен Zinc Finger CCCH», при этом функция *in vivo* или фенотип неизвестны.

Несмотря на то, что геномные последовательности идентичны, заявитель обнаружил, что белки, которые, как утверждается, кодируются C1CG07G008850.1 и Cla97C07G135900.1 (включенные в настоящее описание в SEQ ID NO: 8 и SEQ ID No:9), отличаются. Путем анализа последовательностей мРНК заявитель пришел к выводу, что различия обусловлены ошибками в информации об интронах и экзонах, представленной в базах данных, и на основании данных о последовательностях мРНК было установлено, что правильной последовательностью белка является SEQ ID NO: 1. См. также фиг. 3, на которой представлены все три белка, т.е. белок CG (утверждается, что он кодируется C1CG07G008850.1), белок 97103 (утверждается, что он кодируется Cla97C07G135900.1) и белок WAP7.1 дикого типа (SEQ ID NO: 1), как определено на основе данных РНК.

Известно, что белки «цинковые пальцы» являются регуляторами транскрипции, а белок WAP7.1 содержит несколько консервативных доменов, которые, как известно, играют роль в регуляции транскрипции других генов. SEQ ID NO: 1 содержит четыре консервативных домена, также показанных на Фиг. 2:

- a) «домен связывания Zn», начиная с аминокислоты 114 и заканчивая аминокислотой 159,
- b) «домен связывания пептидов», начиная с аминокислоты 350 и заканчивая аминокислотой 395,
- c) «домен Plus3», начиная с аминокислоты 464 и заканчивая аминокислотой 572, и
- d) «мотив связывания пролина», начиная с аминокислоты 812 и заканчивая аминокислотой 828 SEQ ID NO: 1.

Указанные консервативные домены также представлены на Фиг. 2 (подчеркнуты).

Несмотря на то, что все консервативные домены попрежнему присутствуют в усеченном мутантном белке wap7.1 W1054*, представляется маловероятным, что усеченный белок будет выполнять функцию *in vivo*, а также предполагается, что мутация

представляет собой аллель с потерей функции. Как указывалось ранее, присутствие этого мутантного аллеля *wap7.1* в гомозиготной форме у диплоидного растения арбуза приводит к факультативной партенокарпии, растение дает бессемянные плоды при отсутствии опыления цветков.

Дополнительные мутанты были получены и/или идентифицированы в TILLING-популяции арбуза, имеющей мутации в эндогенном аллеле *wap7.1*, а их фенотип будет подтвержден путем получения растения, которое является гомозиготным по мутантному аллелю. Соответственно, на данный момент были обнаружены следующие мутанты:

Таблица 1

Изменение нуклеотидной последовательности в кодоне	Изменение аминокислоты в SEQ ID NO: 1 (и SEQ ID NO: мутантного белка, содержащего изменение аминокислоты)	Положение в белке (см. также Фиг. 3)	Фенотип растений, гомозиготных по мутантному аллелю
G/A (AGG AAG)	R346K (SEQ ID NO: 11)	Предшественник домена связывания пептидов	Подлежит определению
G/A (AGC AAC)	S324N (SEQ ID NO: 12)	Предшественник домена связывания пептидов	Подлежит определению
C/T (CCT TCT)	P830S (SEQ ID NO: 13)	Вскоре после мотива связывания пролина	Подлежит определению
G/A (GCA ACA)	A328T (SEQ ID NO: 14)	Предшественник домена связывания пептидов	Подлежит определению

G/A (TGG TGA)	W1054* (SEQ ID NO: 2)	С-концевая часть белка	Партенокарпия
С/Т (CAA TAA)	Q373* (SEQ ID NO: 10)	В домене связывания пептидов	Подлежит определению

Таким образом, одним из аспектов настоящего изобретения является растение арбуза, содержащее, по меньшей мере, один мутантный аллель гена *wap7.1*, при этом мутантный аллель приводит к партенокарпии, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме, либо из-за вырабатываемого мутантного белка, который имеет сниженную функцию или утрату функции по сравнению с белком WAP7.1 дикого типа, либо из-за мутантного аллеля, имеющего сниженную или отсутствующую экспрессию гена по сравнению с аллелем дикого типа *WAP7.1*, в результате чего аллель дикого типа WAP7.1 вырабатывается в растении в меньшем количестве или вообще не вырабатывается.

Таким образом, мутантный аллель *wap7.1* может содержать одну или несколько вставленных, делетированных или замененных аминокислот по сравнению с белком WAP7.1 дикого типа, либо мутантный аллель *wap7.1* может включать в себя одну или несколько мутаций в регуляторной области белка, такой как промотор или энхансер, что приводит к уменьшению или отсутствию выработки активного белка дикого типа, что таким образом, в равной степени приводит к факультативной партенокарпии, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

Указанные выше мутанты или другие мутанты в эндогенном гене WAP7.1 растения могут быть получены, например, с помощью случайного или направленного мутагенеза, например, с использованием методов на основе CRISPR. Обзор целевого редактирования генов представлен, например, авторами Эрпен-Далла Корте и др. в работе *Plants* 2019, 8, 601 (doi: 10.3390/plants8120601) и авторами Бед Пракаш Бхатта и Субас Малла в работе *Plants* 2020, 9, 1360; doi:10.3390/plants9101360. Редактирование на основе Crispr также уже выполнялось в арбузах и других бахчевых, и, таким образом, может быть использовано специалистом в данной области техники для редактирования эндогенного гена WAP7.1 арбуза или других бахчевых, содержащих ортологичный ген. Например, CRISPR использовали в случае с огурцом для создания мутантов в гене-мишени, как описано в заявке WO2017098508. Также в случае с арбузом Crispr успешно использовалась для

модификации генов-мишеней, см., например, работы Ван Ю., Ван Дж., Го С. и соавт., в которых описано, как CRISPR/Cas9-опосредованный мутагенез CIBG1 приводил к уменьшению размера семян и способствовал прорастанию семян арбуза. *Hortic Res* 8, 70 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00506-1>.

Что касается мутаций в любом из четырех консервативных доменах (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 (А или Ala), цистеин (С 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 неполярных аминокислот консервативного домена (выбранного из четырех консервативных доменов) замещаются полярной аминокислотой, и/или любая одна (или более) из полярных аминокислот консервативного домена замещаются 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 *war7.1*, имеющий ограниченную функцию или не демонстрирующий наличие функции *in vivo*.

В еще одном аспекте мутантный аллель *war7.1* кодирует укороченный белок, где, по меньшей мере, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213 или более аминокислот в С-концевой области белка *War7.1* дикого типа отсутствуют (например, отсутствуют, по меньшей мере, аминокислоты 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 850, 890, 892, 893, 894), или

необязательно замещены другими аминокислотами, что приводит к тому, что белок имеет сниженную или отсутствующую функцию *in vivo*. По тексту настоящей заявки приведены два примера мутантных аллелей, кодирующих усеченные белки: кодирующих W1054* в SEQ ID NO: 1 (или стоп-кодон для W в эквивалентном положении в белке WAP7.1, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1); или кодирующих Q373* в SEQ ID NO: 1 (или стоп-кодон для Q в эквивалентном положении в белке WAP7.1, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте ген *WAP7.1* арбуза представляет собой ген, кодирующий белок WAP7.1, отличающийся тем, что белок WAP7.1 представляет собой белок SEQ ID NO: 1 или белок, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1. Следует отметить, что белки, которые, как утверждается, кодируются C1CG07G008850.1 (SEQ ID NO: 8) и C1a97C07G135900.1 (SEQ ID NO: 9), на 99,3% и 97,7% идентичны последовательности SEQ ID NO: 1. Таким образом, если указанные белковые последовательности не являются следствием ошибок в информации, которую несут интроны/экзоны, они могут быть функциональными белками (что не утверждается специалистами, как объяснялось выше), они являются предметом настоящей заявки. Как указывалось ранее, геномные последовательности на 100% идентичны последовательности геномной последовательности гена WAP7.1 дикого типа, представленной в настоящем документе в SEQ ID NO: 6.

Ген арбуза *WAP7.1* может также обозначаться *CIWAP7.1* в случае с *Citrullus lanatus* *WAP7.1* и представлен в настоящем документе в виде SEQ ID NO: 6, кодирующей белок SEQ ID NO: 1. Другие культивируемые арбузы могут включать в себя аллельный вариант гена WAP7.1, включающего в себя нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 6, и может кодировать (функциональный) белок WAP7.1 дикого типа, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1. Такие белки по тексту настоящего документа также именуется функциональными вариантами белка SEQ ID NO: 1, а гены называются аллельными вариантами гена SEQ ID NO: 6. Важно отметить, что они должны приводить к факультативной партенокарпии при мутации либо в нокдауну или нокауту экспрессии гена либо, в случаях, когда он мутирован – кодировать сниженную или отсутствующую функцию белка. Например, аллельный вариант, в который вводится такая же мутация, как и полученная в рамках настоящего документа, как, например, изменение одного

нуклеотида (G на A) в рамках нуклеотидной последовательности 7394 SEQ ID NO: 6 (что приводит к замене кодона TGG на кодон TGA, т.е. W1054STOP), должен давать тот же фенотип, когда гомозигота присутствует в диплоидном растении.

В одном аспекте изобретения предложено растение или растительная клетка, причем это растение или растительная клетка имеют пониженную активность белка WAP7.1, по сравнению с соответствующей растительной клеткой дикого типа, при этом белок WAP7.1 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 (арбуз);

b) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих белок, последовательность которого, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99,9% идентична аминокислотной последовательности под номером SEQ ID NO: 1 (арбуз);

c) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих белок, последовательность которого, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99,9% идентична аминокислотной последовательности под номером SEQ ID NO: 1 (арбуз), и причем белок содержит аминокислотную последовательность домена связывания Zn, т.е. аминокислоты 114 – 159 SEQ ID NO: 1, и/или он содержит аминокислотную последовательность домена связывания Zn, т.е. аминокислоты 350 -395 SEQ ID NO: 1, и/или он содержит аминокислоты домена Plus3, аминокислоты 464 – 572 SEQ ID NO: 1, и/или он содержит аминокислоты мотива связывания пролина, т.е. аминокислоты 812 – 828 SEQ ID NO: 1;

d) молекулы нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6 или последовательности, которая, по меньшей мере, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO:6 и кодирующей белок WAP7.1.

Снижение активности белка WAP7.1 вызвано мутантным аллелем *wap7.1*. Снижение активности может быть вызвано нокдауном или нокаутом экспрессии мутантного аллеля *wap7.1* (например, посредством мутации в промоторе или другой регуляторной последовательности) или мутантным аллелем *wap7.1*, кодирующим белок WAP7.1 с потерей функции или с пониженной функцией (мутантный белок WAP7.1).

В одном аспекте мутантный аллель *wap7.1* кодирует мутантный белок WAP7.1, имеющий сниженную или отсутствующую функцию по сравнению с белком дикого типа,

например, мутантный белок WAP7.1 содержит одну или несколько замененных, делетированных и/или вставленных аминокислот по сравнению с белком дикого типа. В одном аспекте аминокислота R346, S324, P830, A328, Q373 и/или W1054 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентная аминокислота в последовательности, которая, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:1) удалена или заменена другой аминокислотой или заменена стоп-кодоном, что приводит к снижению или отсутствию функции белка WAP7.1.

В одном аспекте мутантный белок WAP7.1 содержит одну или несколько аминокислот, которые заменены, делетированы и/или вставлены в консервативный домен белка, выбранного из группы: 1. консервативный «домен связывания Zn» в составе белка 2. Консервативный «домен связывания пептида», 3. консервативный «домен Plus3» и/или 4. консервативный «домен связывания пролина» в составе белка.

В одном аспекте, по меньшей мере, одна аминокислота в консервативном домене (из 4 доменов) заменена другой аминокислотой или СТОП-кодоном, что приводит к отсутствию или снижению функции белка, а также факультативной партенокарпии, когда аллель находится в гомозиготной форме (в случаях, когда в диплоидном растении или растительной клетке нет аллеля дикого типа).

В еще одном аспекте отсутствует одна или несколько аминокислот консервативного домена (из 4 доменов), например в результате мутации, вызывающей преждевременное возникновение СТОП-кодона, что приводит к потере функции или снижению функции белка и факультативной партенокарпии, когда аллель находится в гомозиготной форме (в случаях, когда в диплоидном растении или растительной клетке отсутствует аллель дикого типа).

В еще одном аспекте мутантный белок является усеченным, отсутствуют, по меньшей мере, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213 или более аминокислот в С-концевой области белка Wap7.1 дикого типа SEQ ID NO: 1 (или белка дикого типа, по меньшей мере, на 94% идентичного SEQ ID NO: 1) отсутствуют или в некоторых случаях заменены другими аминокислотами, что приводит к снижению или отсутствию у белка функции *in vivo*. В одном аспекте W в положении 1054 SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении белка, который, по меньшей мере, на 94% идентичен SEQ ID NO: 1, делетирован, или заменен другой аминокислотой, или заменен стоп-кодоном. В одном аспекте Q в положении 373 SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном положении белка,

который, по меньшей мере, на 94% идентичен SEQ ID NO: 1, делегирован, или заменен другой аминокислотой, или заменен стоп-кодоном.

Снижение или отсутствие функции или снижение функции белка присутствует в случаях, когда мутантный аллель меняет фенотип *in vivo* с фенотипа дикого типа, т.е. плодов, развивающихся только после опыления, когда аллель дикого типа присутствует в гомозиготной форме, на факультативную партенокарпию, когда мутантный аллель у диплоидного растения представлен в гомозиготной форме.

Эквивалентные аминокислоты в последовательности, которая, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1 могут быть идентифицированы путем попарного выравнивания (например, с использованием программы Needle) с SEQ ID NO: 1, см., например, фиг. 3. Эквивалентную аминокислоту W1054 SEQ ID NO: 1 или аминокислоту других мутантов, представленных в Таблице 1, можно, например, без труда идентифицировать в SEQ ID NO: 8 и 9, см. фиг. 3, на которой она выделена жирным шрифтом. Эквивалентная аминокислота в вариантной последовательности, по меньшей мере, на 94% идентичная SEQ ID NO: 1, таким образом, представляет собой ту же аминокислоту, при этом она может иметь несколько иное положение в вариантной последовательности, например W1054 SEQ ID NO: 1 может быть, например, в варианте белка W1055, или W1052, или W1053.

В одном аспекте W1054 белка арбуза SEQ ID NO: 1 (или эквивалентной аминокислоты, содержащей, по меньшей мере, 4%, 95%, 96%, 97% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1), замещена другой аминокислотой, удалена или замещена стоп-кодоном.

В одном аспекте Q373 белка арбуза SEQ ID NO: 1 (или эквивалентной аминокислоты, содержащей, по меньшей мере, 4%, 95%, 96%, 97% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1), замещена другой аминокислотой, удалена или замещена стоп-кодоном.

В одном аспекте R346 белка арбуза SEQ ID NO: 1 (или эквивалентной аминокислоты, содержащей, по меньшей мере, 4%, 95%, 96%, 97% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1), замещена другой аминокислотой, удалена или замещена стоп-кодоном.

В одном аспекте S324 белка арбуза SEQ ID NO: 1 (или эквивалентной аминокислоты, содержащей, по меньшей мере, 4%, 95%, 96%, 97% или более

идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1), замещена другой аминокислотой, удалена или замещена стоп-кодоном.

В одном аспекте P830 белка арбуза SEQ ID NO: 1 (или эквивалентной аминокислоты, содержащей, по меньшей мере, 4%, 95%, 96%, 97% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1), замещена другой аминокислотой, удалена или замещена стоп-кодоном.

В одном аспекте A328 белка арбуза SEQ ID NO: 1 (или эквивалентной аминокислоты, содержащей, по меньшей мере, 4%, 95%, 96%, 97% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1), замещена другой аминокислотой, удалена или замещена стоп-кодоном.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 10.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предлагается культурное растение арбуза или часть растения, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена WAP7.1, причем указанный мутантный аллель придает факультативную партенокарпию, когда он находится в гомозиготной форме.

В одном аспекте ген расположен на хромосоме 7 генома арбуза, особенно ген расположен в области, начинающейся с пары оснований 23357225 и заканчивающейся парой оснований 23365257 хромосомы 7 хромосомы Чарльстон Грей, на которой он обозначен как C1CG07G08850.

В одном варианте осуществления растение или часть растения, содержащие мутантный аллель гена WAP7.1, 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 WAP7.1, 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 WAP7.1, дополнительно содержит ген, придающий партенокарпию, например, ген, описанный в WO2018/060444.

Частью растения, содержащей мутантный аллель гена WAP7.1, может быть клетка, цветок, лист, стебель, черенок, семячатонок, пыльца, корень, подвой, привой, плод, протопласт, зародыш, пыльник.

Также в изобретении раскрывается вегетативно размножаемое растение арбуза, которое размножается из такой части растения, содержащей, по меньшей мере, один мутантный аллель гена WAP7.1.

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, включающий выращивание диплоидного растения, содержащего две копии мутантного аллеля гена WAP7.1, 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 WAP7.1, 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 WAP7.1, в частности, в поле без растений-опылителей, и, при необходимости, сбора бессемянных плодов арбуза с указанных растений.

Предложен способ получения факультативного партенокарпического культурного арбуза, включающий следующие этапы:

а) введение мутаций в популяцию растений или семян арбуза; или предоставление популяции мутантных растений или семян (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 WAP7.1; и

d) при необходимости, выращивание растений, полученных на этапе c).

Предложен способ получения факультативного партенокарпического культурного арбуза, включающий следующие этапы:

a) введение мутаций в растение или семена арбуза; или предоставление популяции мутантных растений или семян (например, популяции TILLING, например, M2, M3, M4 или последующего поколения),

b) выбор растения, содержащего мутантный аллель гена WAP7.1;

c) при необходимости, самоопыление выбранного растения с получением растения, гомозиготного по мутантному аллелю гена WAP7.1;

d) при необходимости, выращивание растений.

Растение, семя или плод арбуза, полученные данным способом, раскрываются в настоящем документе.

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

Применение мутантного аллеля *wap7.1* гена WAP7.1 в соответствии с описанием в настоящем документе для получения факультативных партенокарпических растений арбуза также является аспектом изобретения.

Предложен способ получения культурного растения арбуза, 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; или предоставление популяции мутантных растений или семян (например, популяции TILLING, например, M2, M3, M4 или последующего поколения),

b) выбор растения, содержащего мутантный аллель гена *wap7.1*, например, мутантный аллель, который производит значительно уменьшенный белок WAP7.1 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,

с) 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, включающий следующие этапы:

a) анализ содержания в геномной ДНК растения или части растения, или семени мутантного аллеля и/или содержания аллеля дикого типа гена *WAP7.1* в их геноме и, при необходимости,

b) выбор растения или части растения, или семени, содержащих в геноме одну или две копии мутантного аллеля гена *wap7.1*,

причем аллель дикого типа гена *WAP7.1* арбуза кодирует белок SEQ ID NO: 1 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 1).

Этап a) 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, включающий следующие этапы:

a) предоставление образца (или множества образцов) геномной ДНК растения арбуза 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 *WAP7.1* гена *WAP7.1* арбуза, и может гибридизоваться с геномным аллелем и/или амплифицировать часть геномного аллеля в анализе ПЦР, и

с) проведение анализа ПЦР с использованием пары праймеров или анализа гибридизации с использованием зонда этапа б) на образце(ах) этапа а) и, при необходимости,

д) выбор растения или части растения или семени, содержащих одну или две копии аллеля (например, аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля) гена WAP7.1 арбуза, в геноме,

причем ген Wap7.1 аллеля дикого типа арбуза кодирует белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 1).

На этапе б) пара праймеров для ПЦР представляет собой, по меньшей мере, один прямой праймер, комплементарный одной из цепей ДНК аллеля WAP7.1, и один обратный праймер, комплементарный другой цепи ДНК аллеля WAP7.1, причем эта пара праймеров гибридизуется с денатурированной геномной ДНК и амплифицирует часть аллеля WAP7.1 в реакции ПЦР. Праймеры могут разрабатываться для амплификации аллеля дикого типа или любого мутантного аллеля WAP7.1 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 WAP7.1, а также один общий обратный праймер. Эти три праймера можно использовать в KASP-анализе для генотипирования образцов с этапа а). Таким образом, в одном аспекте анализ на этапе с) 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 WAP7.1, например, аллель WAP7.1 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, кодирующую мутантный белок, как описано в Таблице 1, где мутация из таблицы 1 содержится в аллеле дикого типа гена *WAP7.1* арбуза, который кодирует белок SEQ ID NO: 1, или в эквивалентном положении в аллеле дикого типа, кодирующем белок дикого типа *WAP7.1*, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичен SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте растение или часть растения представляет собой арбуз, а мутантный аллель кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

Также предусмотрены способы получения и/или селекции растений или частей растений, содержащих, по меньшей мере, один мутантный аллель гена арбуза *WAP7.1*.

В одном аспекте также предусмотрен способ обнаружения аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена арбуза *WAP7.1* в геноме.

В одном аспекте предусмотрен способ определения наличия в растении арбуза, его части или семени, по меньшей мере, одной копии аллеля дикого типа, например, кодирующего белка SEQ ID NO: 1 (или аллеля дикого типа, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1), и/или содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля, содержащего, например, одну или несколько аминокислот, которые заменены, вставлены или делетированы по отношению к аллелю дикого типа, например кодирующему белок SEQ ID NO: 2, 10, 11, 12, 13 или 14, или мутантный белок, как указано в Таблице 1, и, в некоторых случаях, селекция растения, части растения или семени, содержащего, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *wap7.1*.

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 *WAP7.1* арбуза 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, включающий следующие этапы:

а) предоставление образца (или множества образцов) геномной ДНК растения арбуза, или множества растений (например, популяции F2, инбредных линий, популяции обратного скрещивания, селекционной популяции, гибридных растений и т.д.),

б) 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 *WAP7.1* гена *WAP7.1* арбуза и может гибридизоваться с геномным аллелем и/или амплифицировать часть геномного аллеля в анализе ПЦР, и

с) проведение анализа ПЦР с использованием пары праймеров или анализа гибридизации с использованием зонда этапа б) на образце(ах) этапа а) для получения продукта амплификации ПЦР и/или продукта гибридизации олигонуклеотидов, и, при необходимости,

д) выбор растения или части растения или семени, содержащих одну или две копии аллеля (например, аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля) гена *WAP7.1* в геноме,

причем аллель дикого типа гена *WAP7.1* арбуза кодирует белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 1).

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

а) предоставление образца (или множества образцов) геномной ДНК растения арбуза, или множества растений (например, популяции F₂, инбредных линий, популяции обратного скрещивания, селекционной популяции, гибридных растений и т.д.),

б) 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 WAP7.1 гена WAP7.1 арбуза и может гибридизоваться с геномным аллелем и/или амплифицировать часть геномного аллеля в анализе ПЦР, и

с) проведение анализа ПЦР с использованием пары праймеров или анализа гибридизации с использованием зонда этапа б) на образце(ах) этапа а) для получения продукта амплификации ПЦР и/или продукта гибридизации олигонуклеотидов, и, при необходимости,

д) выбор растения или части растения, или семени, содержащего одну или две копии аллеля (например, аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля) гена WAP7.1 арбуза в геноме,

причем аллель дикого типа гена WAP7.1 арбуза кодирует белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 1).

Также предоставляется набор для генотипирования, включающий праймеры и/или зонды и реакционные компоненты для амплификации и/или гибридизации части геномной ДНК гена WAP7.1.

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, семечки, 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 *WAP7.1* (где расположен ген *WAP7.1*; аллели гена могут быть аллелями дикого типа, обозначенными как *WAP7.1*, или мутантными аллелями, обозначенными как *wap7.1*), 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 *wap7.1* (т.е. *wap7.1/wap7.1*) или одна копия мутантного аллеля *wap7.1* и одна копия аллеля дикого типа (т.е. *wap7.1/WAP7.1*). Аналогичным образом триплоидное растение называют гомозиготным по гену, если оно имеет три идентичных аллеля гена (например, три копии мутантного аллеля *wap7.1*, т.е. *wap7.1/wap7.1wap7.1*), а тетраплоидное растение называют гомозиготным по гену, если оно имеет четыре идентичных аллеля гена, например, четыре копии мутантного аллеля *wap7.1* (т.е. *wap7.1/wap7.1/wap7.1/wap7.1*).

«Ген WAP7.1» представляет собой единственный рецессивный ген, идентифицированный в культурном арбузе на хромосоме 7, мутация которого приводит к партенокарпии, в частности, к факультативной партенокарпии. WAP7.1 представляет собой функциональный аллель дикого типа (АДТ), присутствующий в непартенокарпических культурных растениях арбуза, а *wap7.1* представляет собой мутантный аллель, приводящий к партенокарпии, если аллель находится в гомозиготной форме в диплоидном (*wap7.1/wap7.1*), триплоидном (*wap7.1/wap7.1/wap7.1*), тетраплоидном (*wap7.1/wap7.1/wap7.1/wap7.1*) или другом полиплоидном, например, октаплоидном растении и т.д. В одном аспекте ген WAP7.1 представляет собой ген, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, или белок, имеющий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97% или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, при попарном выравнивании.

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 WAP7.1 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 *wap71*» или «аллель *wap71*» в настоящем документе относится к мутантному аллелю гена WAP71 на хромосоме 7 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 *wap71* представляет собой мутантный аллель гена *WAP71*, при этом ген *WAP71* 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% или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 (при попарном выравнивании).

Термин «аллель *WAP71* дикого типа» или «аллель *WAP71*» в настоящем документе относится к функциональному аллелю гена *WAP71*, который вызывает у растения нормальное завязывание плодов, требующее нормального опыления и оплодотворения для завязывания плодов. Аллель *WAP71* дикого типа имеется в любом коммерческом сорте арбуза (например, сорт Nunhems Premium F1, Montreal F1 и другие). В одном аспекте аллель *WAP71* дикого типа представляет собой аллель дикого типа гена *WAP71*, причем ген *WAP71* 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% или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 (при попарном выравнивании).

Термин «локус» означает определенное место или места, или участок на хромосоме, где находится, например, ген или генетический маркер. Таким образом, локус *WAP7.1* представляет собой место в геноме арбуза, где находится мутантный аллель и/или аллель дикого типа гена *WAP7.1*. Локус *WAP7.1* представляет собой локус на хромосоме 7 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. *wap7.1* был создан в геноме культурного арбуза путем мутагенеза, и мутантный аллель *wap7.1* 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 отростку), 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 WAP7.1 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 родителем используется для индукции завязывания плодов и производства семян на тетраплоидном женском родителе, в результате чего получаются плоды, содержащие гибридные триплоидные семена F1. И мужской, и женский родитель, используемые для получения триплоидных семян F1, являются инбредными, и поэтому обе родительские линии являются 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. 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 *wap7.1* 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.

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

«Маркер ОНП» относится к однонуклеотидному полиморфизму, например, между мутантным аллелем *wap7.1* и аллелем дикого типа *WAP7.1*. Например, SEQ ID NO: 5 обеспечивает последовательность, содержащую ОНП в нуклеотиде 51, отличающуюся тем, что наличие «G» (гуанина) указывает на присутствие аллеля дикого типа *WAP7.1*, а присутствие «A» (аденина) указывает на присутствие мутантного аллеля, который кодирует белок SEQ ID NO: 2 (мутация W1054STOP). При помощи анализа маркера ОНП, который позволяет различать мутантный аллель и аллель дикого типа гена *WAP7.1* (т.е. аллель-специфический анализ), можно проводить скрининг растений, частей растений или их ДНК на наличие мутантного аллеля и/или аллеля дикого типа. Для любого из маркеров ОНП, например, указанных в Таблице 1, анализ маркеров ОНП могут разрабатываться на основе последовательностей, представленных в настоящем документе. Указанный анализ маркеров ОНП можно использовать для обнаружения мутантного аллеля, например, в ходе селекции с помощью маркеров и/или анализах генотипирования ОНП. Таким образом, используя анализ маркеров ОНП, который позволяет различать мутантный аллель гена и аллель дикого типа (например, в аллель-специфическом анализе), можно проводить скрининг растений, частей растений или их ДНК на наличие мутантного аллеля.

«Маркер INDEL» относится к полиморфизму инсерции/делеции, например, между мутантным аллелем *wap7.1* и аллелем *WAP7.1* дикого типа. Используя анализ маркера INDEL, который позволяет различать мутантный аллель гена и аллель дикого типа (например, 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 7» 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 *war7.1*» относится к геномной области, например, хромосомы 7 культурного арбуза, который несет мутантный аллель *war7.1*. Наличие аллеля можно определить фенотипически и/или по наличию одного или более молекулярных маркеров, например, маркеров ОНП, маркеров INDEL или других маркеров, сцепленных с мутантным аллелем *war7.1*, или предпочтительно маркеров, отличающих разные аллели *war7.1*, или по геномной последовательности самой последовательности аллеля (например, секвенирование аллеля). Маркер «связан с аллелем *war7.1*», 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.

Аллель-специфический маркер предпочтительно представляет собой маркер в самом аллеле, т.е. в промоторной области или транскрибируемой области гена, например, на основе полиморфизма между последовательностью аллеля дикого типа и последовательностью мутантного аллеля.

Пара «фланкирующих маркеров» относится к двум маркерам, предпочтительно двум маркерам ОНП или двум последовательностям, содержащим маркеры ОНП, которые связаны с аллелем *war7.1*, и/или которые тесно связаны с аллелем *war7.1*, посредством чего аллель *war7.1* 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 *wap7.1*), 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.

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 7, содержащая мутантный аллель *wap7.1*.

«Обратное скрещивание» относится к методу селекции, с помощью которого (одиночный) 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.

«Маркерная селекция» или «МС» представляет собой процесс использования наличия молекулярных маркеров (таких как ОНП-маркеры или INDEL-маркеры), которые генетически и физически связаны с конкретным локусом или определенной областью хромосомы или специфическими маркерами аллеля, для селекции растений на наличие определенного локуса, области или аллеля. Например, молекулярный маркер, генетически и физически связанный с мутантным аллелем *wap7.1* или аллель-специфический маркер можно использовать для обнаружения и/или селекции, например, растений арбуза или частей растений, содержащих аллель *wap7.1*. Чем теснее сцепление молекулярного маркера с локусом, тем менее вероятно, что маркер диссоциируется от локуса посредством мейотической рекомбинации. Аналогичным образом, чем теснее два маркера связаны друг с другом, тем меньше вероятность того, что два маркера будут отделены друг от друга (и тем больше вероятность того, что они разделятся как единое целое). Аллель-специфические маркеры являются предпочтительными маркерами, поскольку они позволяют напрямую выбрать аллель.

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 неслучайно, 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 пластидный 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 EMBOSS, 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%, 93%, 94%, 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

гибридизирует 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.

«Усечение» обозначает отсутствие, по меньшей мере, одного нуклеотида либо в концевой области 3' либо концевой области 5' нуклеотидной последовательности по сравнению с нуклеиновой последовательностью соответствующей последовательности дикого типа, или что в N-концевой области либо C-концевой области белка по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующего белка дикого типа отсутствует, по меньшей мере, одна аминокислота, при этом предпочтительно, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более аминокислот. Концевая область 5' определяется кодоном ATG, используемым в качестве стартового кодона в трансляции соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты 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 WAP7.1, по сравнению с соответствующей клеткой растения дикого типа или соответствующим растением дикого типа. Снижение в одном аспекте должно включать полный нокаут или нокаун экспрессии гена, или производство белка WAP7.1 с потерей функции или с ее понижением, например, мутантный белок WAP7.1 может характеризоваться потерей функций или ее понижением, по сравнению с функциональным белком WAP7.1 дикого типа. Понижение активности может происходить в результате снижения экспрессии гена, кодирующего белок WAP7.1 (также называемое нокауном), или нокаута экспрессии гена, кодирующего белок WAP7.1, и/или уменьшения количества белка WAP7.1 в клетках, или же понижения или потери функции активности белка WAP7.1 в клетках.

В контексте настоящего изобретения термин «клетка растения дикого типа» или «растение дикого типа» означает, что они содержат аллели *wap7.1* дикого типа, а не мутантные аллели *wap7.1*. Таким образом, растение дикого типа или растительная клетка дикого типа представляет собой растение или растительную клетку, содержащую

полностью функциональные гены WAP7.1, кодирующие полностью функциональные белки WAP7.1 (также называемые белком WAP7.1 дикого типа), например, в отношении растений арбуза или растительных клеток диплоидного растения арбуза, производящего белок SEQ ID NO: 1 (или белок, имеющий, по меньшей мере, 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1) и дающего плоды только после опыления.

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 доменам белков, таким как «домен связывания Zn» (или домен связывания цинка), «домен связывания пептида», «домен Plus3» и «домен связывания пролина», которые, вероятно, участвуют в функции белков в регуляции транскрипции (подавление или активация) других генов. В белке WAP7.1 арбуза SEQ ID NO: 1 «домен связывания Zn» обнаружен в аминокислотах 114 – 159 или в эквивалентных аминокислотах в белке, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96% или более идентичен последовательности SEQ ID NO: 1. В белке WAP7.1 арбуза SEQ ID NO: 1 «домен связывания пептида» обнаружен в аминокислотах 350 – 395 или в эквивалентных аминокислотах в белке, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96% или более идентичен последовательности SEQ ID NO: 1. В белке WAP7.1 арбуза SEQ ID NO: 1 «домен Plus3» обнаружен в аминокислотах 464 – 572 или в эквивалентных аминокислотах в белке, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96% или более идентичен последовательности SEQ ID NO: 1. В белке WAP7.1 арбуза SEQ ID NO: 1 «домен связывания пролина» обнаружен в аминокислотах 812 – 828 или в эквивалентных аминокислотах в белке, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96% или более идентичен последовательности SEQ ID NO: 1. Консервативные домены, например, можно найти в базе данных охраняемых доменов Национального центра биотехнологической информации (сайт: ncbi.nlm.nih.gov/cdd).

«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 WAP7.1 арбуза (кодирующий белок SEQ ID NO: 1, или белок дикого типа, встречаемость, по меньшей мере, 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1). Описанные в настоящем документе мутанты можно, например, воспроизвести путем целенаправленного редактирования гена WAP7.1 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. Микропанели 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 C.

Фигура 1: Фотография среза плода арбуза, развившегося без опыления на растении, гомозиготном по мутантному аллелю *wap7.1*, кодирующему белок, в котором нуклеотид гуанин в положении 7394 SEQ ID NO: 6 заменен нуклеотидом аденина, в результате чего кодон TGG (кодирующий W) заменяется на TGA (стоп-кодон). Аминокислота W в положении 1054 SEQ ID NO: 1, соответственно, заменена преждевременным стоп-кодоном.

Фигура 2: Парное выравнивание белковых последовательностей (с использованием ПО Needle из пакета EMBOSS) белка WAP7.1 дикого типа арбуза SEQ ID NO: 1 (обозначенного «WAP7.1WT») и мутантного усеченного белка WAP7.1 SEQ ID NO: 2 (обозначенного «wap7.1»). Консервативные домены белка подчеркнуты.

Фигура 3: Множественное выравнивание последовательностей белка WAP7.1 дикого типа SEQ ID NO: 1 арбуза (обозначенного «WAP7.1»), кодируемого SEQ ID NO: 6, и белков, которые, в соответствии с *cucurbitgenomics.org*, кодируются C1CG07G008850.1 в геноме Charleston Grey (обозначен «CG», SEQ ID NO: 8) и ClA97C07G135900.1 в геноме арбуза 97103 V2 (обозначен «97103»; SEQ ID NO: 9). W на аминокислоте 1054 SEQ ID NO: 1 выделен жирным шрифтом, как и другие мутанты в Таблице 1. Геномная последовательность всех трех на 100% идентична SEQ ID NO: 6.

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 WAP7.1.

Ген WAP7.1 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 партенокарпового арбуза, идентифицированного изобретателями, с элитной линией арбуза, позволила картировать ген WAP7.1 в области на хромосоме 7. Дальнейший анализ в двух картирующих популяциях привел к идентификации гена, содержащий мутацию, которая привела к преждевременному стоп-кодону и усечению кодируемого белка. Замена одного нуклеотида (гуанин на аденин) в нуклеotide 7394 геномной последовательности SEQ ID NO:7, соответствующая замене одного нуклеотида (гуанин на аденин) нуклеотида 3162 последовательности кДНК SEQ ID NO: 4, привела к получению кодона TGr (кодирующего аминокислоту W, или Tgr, или триптофан), мутировавшего в TGA (трансляционный стоп-кодон). Мутация была уникальной для данной линии и не обнаруживалась в 93 линиях, подвергнутых повторному секвенированию всего генома. Ген получил название WAP7.1 (от гена партенокарпии арбуза на хромосоме 7). Для скрининга растений на наличие мутантного аллеля был разработан аллель-специфический маркер, представленный в SEQ ID NO: 5.

В мутантном партенокарпическом растении арбуза кодон триптофана (W или Tgr) на аминокислоте в положении 1054 белка WAP7.1 дикого типа (SEQ ID NO: 1) был заменен стоп-кодоном в мутантном белке, который таким образом преждевременно заканчивался на аминокислоте 1053 (SEQ ID NO:2), как показано на фигуре 2. В кДНК мутантного аллеля (SEQ ID NO: 4) нуклеотид 3162 представляет собой аденин (A), тогда как в кДНК *war7.1* дикого типа он представляет собой гуанин (G) (SEQ ID NO: 3). Такое изменение одного нуклеотида (или ОНП от GA) приводит к изменению кодона с кодона TGG (кодирующего Tgr или W) на TGA (стоп-кодон).

Было обнаружено, что данное усечение белка WAP7.1 приводит к тому, что белок является нефункциональным или для него характерна сниженная функция *in vivo*. В результате растение, гомозиготное по этому мутантному белку (и, следовательно, лишенное функционального белка дикого типа), дает плоды без косточек в отсутствие опыления и нормальные семенные плоды при опылении. Глядя на прогноз свойств структуры белка WAP7.1 дикого типа в RaptorX (сайт: raptorx.uchicago.edu/StructurePropertyPred/predict/), можно увидеть, что аминокислоты ниже W1054 содержат ряд петель и альфа-спиралей, что указывает на то, что С-концевой белок участвует в общем сворачивании и функционировании белка, что объясняет, почему отсутствие таких структур снижает функциональность белков или делает их нефункциональными.

В одном аспекте представлено растение арбуза или часть растения, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, названного WAP7.1, причем указанный мутантный аллель либо

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

б) кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, замещенных, вставленных или делетированных по сравнению с белком дикого типа,

при этом указанный мутантный аллель а) или б) придает факультативную партенокарпию в случаях, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, и при этом аллель арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или белок, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96% или более идентичен последовательности SEQ ID NO: 1.

Функциональный белок WAP7.1 дикого типа арбуза представлен в SEQ ID NO: 1 (арбуз). Однако в арбузах могут присутствовать некоторые вариации аминокислотной последовательности, а функциональные белки WAP7.1 могут включать, например, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более аминокислот, которые отличаются от SEQ ID NO: 1, которые предусмотрены настоящим документом или в которых белок, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,3%, 99,4 %, 99,5% или 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичен последовательности белков SEQ ID NO: 1 (при попарном выравнивании с использованием, например, программы Needle из пакета Emboss). Например, белки WAP7.1 SEQ ID NO: 8 или 9 могут быть

функциональными, хотя непонятно, настоящие ли они или это обусловлено ошибкой в базах данных.

Таким образом, в одном аспекте функциональные варианты белка арбуза SEQ ID NO: 1 представляют собой белки, которые, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,3%, 99,4%, 99,5% или 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичны последовательности белка SEQ ID NO: 1, при попарном выравнивании (с использованием, например, программы Needle с параметрами по умолчанию). В одном аспекте изменение аминокислотной последовательности обнаруживается за пределами четырех консервативных доменов, которые представляют собой домен связывания Zn, домен связывания пептидов, домен Plus3 и мотив связывания пролина. В одном аспекте функциональные белки, которые, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,3%, 99,4%, 99,5% или 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичны белку SEQ ID NO: 1, соответственно, содержат 100% аминокислот, идентичных SEQ ID NO: 1 в случае с четырьмя консервативными доменами, указанными и представленными на Фиг. 2 (подчеркнуты).

Поскольку четыре консервативных домена являются высококонсервативными внутри вида, предполагается, что любая мутация (делеция, вставка и/или замена, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот) в любом из четырех консервативных доменов приведет к возникновению мутантного белка WAP7.1, который имеет сниженную или отсутствующую функцию *in vivo*, что, соответственно, приводит к факультативному партенокарпическому фенотипу, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, например, у диплоидных растений.

Таким образом, вставка, удаление и/или замена одной или нескольких аминокислот в домене связывания Zn, домене связывания пептидов, домене Plus3 или мотиве связывания пролина отрицательно скажется на функции белка.

Таким образом, в одном аспекте представлено растение арбуза или часть растения, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, именуемого WAP7.1, отличающегося тем, что указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий одну или несколько аминокислот, вставленных, делетированных или замененных в домене связывания Zn белка, начиная с аминокислоты 114 и заканчивая аминокислотой 159 SEQ ID NO: 1 (арбуз) или эквивалентные аминокислоты в варианте белка WAP7.1, последовательность которого, по меньшей мере, на 94 % идентична SEQ ID NO: 1, и отличающийся тем, что указанный мутантный аллель придает

факультативную партенокарпию в случаях, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

Таким образом, в еще одном аспекте представлено растение арбуза или часть растения, содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, именуемого WAP7.1, отличающегося тем, что указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий одну или несколько аминокислот, вставленных, делетированных или замененных в домене связывания пептида белка, начиная с аминокислоты 350 и заканчивая аминокислотой 395 SEQ ID NO: 1 (арбуз) или эквивалентные аминокислоты в варианте белка WAP7.1, последовательность которого, по меньшей мере, на 94 % идентична SEQ ID NO: 1, и отличающийся тем, что указанный мутантный аллель придает факультативную партенокарпию в случаях, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

В еще одном аспекте представлено растение арбуза или часть растения, содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, названного WAP7.1, отличающегося тем, что указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий одну или несколько аминокислот, вставленных, делетированных или замененных в домене Plus3 белка, начиная с аминокислоты 464 и заканчивая аминокислотой 572 SEQ ID NO: 1 (арбуз) или эквивалентные аминокислоты в варианте белка WAP7.1, последовательность которого, по меньшей мере, на 94 % идентична SEQ ID NO: 1, и отличающийся тем, что указанный мутантный аллель придает факультативную партенокарпию в случаях, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

В еще одном аспекте представлено растение арбуза или часть растения, содержащая, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, названного WAP7.1, отличающегося тем, что указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий одну или несколько аминокислот, вставленных, делетированных или замененных в мотиве связывания пролина белка, начиная с аминокислоты 812 и заканчивая аминокислотой 828 SEQ ID NO: 1 (арбуз) или эквивалентные аминокислоты в варианте белка WAP7.1, последовательность которого, по меньшей мере, на 94 % идентична SEQ ID NO: 1, и отличающийся тем, что указанный мутантный аллель придает факультативную партенокарпию в случаях, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

Термины «начиная с» и «заканчивая» или «с» и «по» включают в себя первую и последнюю указанные аминокислоты.

Таким образом, вставка, делеция и/или замена одной или нескольких аминокислот в домене связывания Zn, домене связывания пептидов, домене Plus3 или мотиве связывания пролина может представлять собой вставку, делецию и/или замену, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

В еще одном аспекте представлено растение арбуза или часть растения, содержащая, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, именуемого WAP7.1, отличающегося тем, что указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 или более аминокислот, которые вставлены, делетированы и/или заменены в SEQ ID NO: 1 или в варианте белка WAP7.1 или белке, последовательность которого, по меньшей мере, на 94% идентична SEQ ID NO: 1, и отличающийся тем, что указанный мутантный аллель придает факультативную партенокарпию в случаях, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме. Таким образом, мутантный белок WAP7.1 может, например, быть усеченным в N-концевой или C-концевой области и не иметь, по меньшей мере, 10 или более указанных аминокислот в N-концевой или C-концевой области, или любые другие, по меньшей мере, 10 аминокислот могут быть делетированы, заменены или вставлены по сравнению с функциональным белком WAP7.1 дикого типа.

В еще одном аспекте представлено растение арбуза или часть растения, содержащая, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, именуемого WAP7.1, отличающегося тем, что указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более аминокислот, которые вставлены, делетированы и/или заменены в SEQ ID NO: 1 или в варианте белка WAP7.1 или белке, последовательность которого, по меньшей мере, на 94% идентична SEQ ID NO: 1, и отличающийся тем, что указанный мутантный аллель придает факультативную партенокарпию в случаях, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме. Таким образом, по сравнению с функциональным белком WAP7.1 дикого типа мутантный белок WAP7.1 может содержать, по меньшей мере, 1 делетированную, замененную или вставленную аминокислоту. Например, делетированная или замененная аминокислота (например, стоп-кодонами или другой аминокислотой) может представлять собой R346, S324, P830, A328, Q373 или W1054, как показано в Таблице 1.

Мутантные аллели можно получать с помощью различных методов, таких как случайный мутагенез или целенаправленное редактирование генов, а затем анализировать фенотип мутантного аллеля в растениях, гомозиготных по мутантному аллелю.

Любой мутантный аллель, который приводит к инсерции, делеции и/или замене одной или нескольких аминокислот функционального белка дикого типа, может привести к мутантному белку с сокращенной или отсутствующей функцией и, таким образом, получить фенотип факультативной партенокарпии, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме. Растения и части растений, содержащие указанные мутантные аллели, представляют собой один вариант осуществления настоящего изобретения.

«Эквивалентную аминокислоту» можно без труда определить путем выравнивания аминокислотной последовательности, см., например, фиг. 3, где эквивалентные аминокислоты выделены жирным шрифтом.

Мутация в кодоне может представлять собой вставку (по меньшей мере, одного) нуклеотида, делецию или замену в кодоне, в результате чего, например, возникает другая рамка считывания или другой кодон, например, кодирующий другую аминокислоту или стоп-кодон. Также весь кодон может быть делегирован или заменен другим кодоном (при этом необязательно стоп-кодоном), что приводит к делеции кодируемой аминокислоты или к ее замене.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение или стоп-кодон аминокислоты номер W1054 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение или стоп-кодон аминокислоты номер R346 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение или стоп-кодон аминокислоты номер S324 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение или стоп-кодон аминокислоты номер P830 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение или стоп-кодон аминокислоты номер A328 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в

белке, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение или стоп-кодон аминокислоты номер Q373 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует мутантный белок WAP7.1, который включает в себя, по меньшей мере, усеченные 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 213 аминокислоты в С-концевой области белка SEQ ID NO: 1 С-концевой области белка, который, по меньшей мере, на 94% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1. В одном аспекте все аминокислоты, начиная с аминокислоты W1054 SEQ ID NO (включительно): 1, или эквивалентную аминокислоту в белке, который, по меньшей мере, на 94% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, делетированы или заменены одной или несколькими различными аминокислотами. В еще одном аспекте все аминокислоты, начиная с аминокислоты Q373 SEQ ID NO (включительно): 1, или эквивалентную аминокислоту в белке, который, по меньшей мере, на 94% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, делетированы или заменены одной или несколькими различными аминокислотами.

Как упоминалось ранее, растение, семя или часть растения арбуза может содержать мутантный аллель *wap7.1*, 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 *wap7.1*, можно отследить и идентифицировать. Направленный мутагенез представляет собой способы, посредством которых мутации вводят конкретно в целевой ген, такой как ген *wap7.1*, 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, 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 *wap7.1* 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 *wap7.1* 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 *WAP7.1* дикого типа, который подвергся мутации (с использованием целенаправленного или случайного мутагенеза) в локусе генома, где расположен аллель дикого типа.

В одном аспекте растение арбуза является диплоидным и содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *wap7.1* 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 одном аспекте растение арбуза является диплоидным и содержит две копии мутантного аллеля *wap7.1* в соответствии с описанием выше, т.е. растение является гомозиготным. Таким образом, растение также является факультативным партенокарпием, 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 *wap7.1*, предпочтительно представляют собой культивируемые, а не дикие растения. Поэтому предпочтительнее культурный арбуз (*Citrullus lanatus*). 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 *wap7.1*. 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 *wap7.1*.

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 стenosпермокарпию, 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 *wap7.1* в своем геноме.

В одном аспекте также предложен способ получения бессемянных плодов арбуза, включающий выращивание диплоидного растения арбуза, содержащего две копии мутантного аллеля *wap7.1* 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 *wap7.1* 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 WAP7.1, или отбора растения, семян или части растения, содержащих мутантный аллель гена, называемого WAP7.1, или для создания растения, семени или части растения, содержащих мутантный аллель гена, называемого WAP7.1, причем указанный мутантный аллель либо

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

б) кодирует мутантный белок, содержащий одну или несколько аминокислот, которые замещены, вставлены и/или делетированы по сравнению с белком дикого типа,

отличающийся тем, что аллель арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или белок, который, по меньшей мере, на 94% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте мутантный аллель *wap7.1* включает в себя мутацию в геномной ДНК, которая приводит к экспрессии мутантного белка WAP7.1, содержащего одну или несколько вставленных, делетированных или замененных аминокислот, как описано выше, например, W1054 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентная аминокислота в последовательности, которая, по меньшей мере, на 94% идентична SEQ ID NO:1) или, например, как показано в Таблице 1.

Однако при этом различные мутантные аллели гена WAP7.1, вызывающие факультативную партенокарпию в гомозиготной форме, также являются вариантами осуществления изобретения. Такие различные мутантные аллели *wap7.1* без особых усилий могут быть получены специалистом в данной области. Квалифицированный специалист может, например, создать другие мутанты в гене WAP7.1 и определить, приводит ли их создание в равной степени к факультативной партенокарпии в гомозиготной форме у диплоидного растения арбуза.

После идентификации нуклеотидной последовательности гена специалист может получить растения арбуза, содержащие мутанты в гене WAP7.1, 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, например, в промоторе или кодирующей последовательности гена. Затем специалист в данной области может подтвердить фенотип

растения, гомозиготного по мутантному аллелю *wap7.1*, т.е. являющегося факультативным партенокарпом. Следовательно, специалист в данной области не ограничен специфическими мутантами WAP7.1, 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 *wap7.1* арбуза, 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 WAP7.1 белка дикого типа, присутствующее в клетке или растении. В качестве альтернативы могут быть получены мутации, которые приводят к снижению или потере функции белка WAP7.1, т.е. мутации (такие как миссенс-мутации или мутации сдвига рамки считывания), которые приводят к замещению, вставке и/или удалению одной или более аминокислот, или посредством которых белок укорачивается путем введения преждевременного стоп-кодона в кодирующую последовательность (несмысловые мутации). Поскольку белок WAP7.1 содержит четыре консервативных домена, в одном аспекте подразумевается, что одна или более аминокислот замещены, вставлены и/или удалены в любой из этих доменов, поскольку такие мутации, вероятно, уменьшат 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, включающий следующие этапы:

а) введение мутаций в (популяции) растения (растений) арбуза или семян, в частности, культурных растений, или предоставление (популяции) мутировавших растений или семян или их потомства;

б) выбор растения, дающего бессемянные плоды без опыления женских цветков, а также плоды с семенами после опыления женских цветков;

с) при необходимости, определение наличия в растении, выбранном в соответствии с пунктом б), мутантного аллеля гена WAP7.1; и

d) при необходимости, выращивание растений, полученных на этапе с).

Этапы b) и с) также можно поменять местами, в результате чего на этапе b) выбирают растение, содержащее мутантный аллель гена WAP7.1, а на этапе с) 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, 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 WAP7.1 путем опыления женских цветков, что позволит увидеть, засеяны ли плоды после опыления, генотипирования растений на наличие мутаций в гене WAP7.1 и кодируемом белке или же экспрессии гена WAP7.1, 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 WAP7.1 в фенотипически отобранном растении.

Если этап b) представляет собой отбор растений, содержащих мутантный аллель гена WAP7.1, специалист в данной области также может использовать различные способы обнаружения ДНК, мРНК или белка гена WAP7.1, чтобы идентифицировать растение, содержащее мутантный аллель *wap7.1*. Геномная ДНК гена *wap7.1* арбуза дикого типа, кодирующего функциональный белок WAP7.1 (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: 3. Промотор находится выше этой последовательности и может быть извлечен, например, путем секвенирования или из базы данных геномов арбуза. 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 WAP7.1 дикого типа, могут составлять не менее 90%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6.

В одном аспекте мутантный аллель гена WAP7.1 представляет собой мутантный аллель, наличие которого приводит к пониженной экспрессии или отсутствию экспрессии гена WAP7.1, или представляет собой мутантный аллель, приводящий к замещению, вставке или удалению одной или более аминокислот кодируемого белка WAP7.1, по сравнению с белком WAP7.1 дикого типа.

В одном аспекте мутантный аллель гена WAP7.1 может быть получен путем индукции мутаций, направленных или случайных, в ген (промотор или другие регуляторные элементы, сайты сплайсинга, кодирующую область и т.д.) и селекции растений, например, из потомства, содержащего мутантный аллель *wap7.1*. В одном аспекте выбирают аллель, мутацию в кодоне, особенно в кодоне домена связывания Zn, домена связывания пептида, домена Plus3 или мотива связывания пролина, например, мутацию, вызывающую замену аминокислоты, сдвиг рамки считывания или стоп-кодон. В одном аспекте мутантный аллель вызывает усечение кодируемого белка WAP7.1 арбуза.

В одном аспекте ОНП-маркер аденин (A) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 (маркер mWM23348403) обнаружен в геноме растения арбуза или его части, или его ДНК. Данный ОНП-маркер позволяет определить аллель, содержащий мутацию W1054STOP в арбузе. В еще одном аспекте ОНП-маркер, представленный в Таблице 1, определяют в геноме растения арбуза или его части, или его ДНК, для выявления мутантного аллеля, представленного в Таблице 1, вызывающего аминокислотное изменение по отношению к белку дикого типа SEQ ID NO: 1 или эквивалентное аминокислотное изменение в белке дикого типа, характеризующееся, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97% или более идентичностью с последовательностью SEQ ID NO: 1.

В случае с другими мутантными аллелями *wap7.1* могут быть легко разработаны аналогичные ОНП-маркеры (или другие маркеры) и анализы генотипирования ОНП (или другого генотипирования). Таким образом, настоящим документом предусмотрены аллель-специфические маркеры и способы обнаружения, особенно в случае с любым мутантным аллелем, который приводит к вставке, делеции или замене аминокислоты в одном из консервативных доменов белка WAP7.1 арбуза, а также других мутантных аллелей.

Особенно в одном аспекте генотип маркера mWM23348403 может быть определен и использован для селекции потомства растения, содержащего аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 и, таким образом, включающего мутантный аллель *wap7.1*, в котором кодируемый белок WAP7.1 усечен и лишен всех аминокислот далее по (С-концевой области) аминокислоты 1053 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентной последовательности аминокислот, которая, по меньшей мере, на 94% идентична SEQ ID NO: 1). Аналогичные аллель-специфические маркеры для других мутантных аллелей (например, как показано в Таблице 1) могут быть легко сконструированы специалистом в данной области техники и использованы в анализах генотипирования или для селекции в рамках программ выведения.

Диплоидное растение, которое является гетерозиготным по *wap7.1* (т.е. *wap7.1/WAP7.1*), будет гетерозиготным по ОНП-маркеру, т.е. будет иметь генотип 'AG' для нуклеотида 51 SEQ ID NO: 5 (т.е. растение содержит одну хромосому, имеющую аденин, А, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 или нуклеотиде 51 последовательности, которая, по меньшей мере, на 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или более идентична последовательности SEQ ID NO:5, и вторую хромосому, содержащую гуанин, G, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 или в нуклеотиде 51 последовательности, которая, по меньшей мере, на 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или более идентична последовательности SEQ ID NO:5), в то время как растение, которое является гомозиготным по *wap7.1* (т.е. *wap7.1/wap7.1*), будет иметь генотип «AA» для нуклеотида 51 SEQ ID NO: 5 (т.е. растение содержит две хромосомы, обе из которых содержат аденин, А, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 или в нуклеотиде 51 последовательности, которая, по меньшей мере, на 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или более идентична последовательности SEQ ID NO:5).

Маркер mWM23348403 был создан на основе индуцированной мутации нуклеотида 7394 (гуанина) в геномной ДНК гена дикого типа *WAP7.1* SEQ ID NO: 6 в аденин (G7394A), при этом кодон TGG (кодирующий Trp или W) заменяется на кодон TGA, кодирующий стоп-кодон, что приводит к остановке трансляции и усеченному белку WAP7.1. Таким образом, нуклеотид 7394 геномной последовательности WAP7.1 SEQ ID NO: 6 соответствует нуклеотиду 51 маркера mWM23348403 SEQ ID NO: 5.

Специфичные для мутантных аллелей маркеры и анализы маркеров могут быть с одинаковой легкостью разработаны для любого мутантного аллеля *wap7.1* (например, те, что приведены в Таблице 1), как основное геномное изменение, например, в кодоне его можно использовать для маркерного анализа для обнаружения геномного изменения,

например, лежащих в основе аминокислотных изменений, представленных в настоящем документе, или других геномных изменений в мутантном аллеле *wap7.1* по сравнению с аллелем дикого типа *WAP7.1*.

С использованием таких аллель-специфических маркеров, которые позволяют выявить конкретный мутантный аллель *wap7.1*, можно проводить генотипирование для определения присутствия и количества копий аллеля в растениях и растительном материале (или полученной из них ДНК). Так, у диплоидов маркерный генотипом вышеуказанного мутантного аллеля *wap7.1* (лежащий в основе изменения белка W1054STOP в арбузе) является «АА» в случаях, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме. У триплоидов или тетраплоидов маркерный генотип можно использовать для определения числа копий мутантного аллеля. Таким образом, генотип может быть, например, ААА, если в триплоиде присутствуют три копии, или АААА, если в тетраплоиде присутствуют четыре копии, или ААG, если в триплоиде присутствуют две копии, и т.д.

Растения и части растений

В одном варианте осуществления предлагается культурный арбуз или его часть (такая как клетка, ткань, орган, плод и т.д.), содержащая, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, называемого WAP7.1, 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 WAP7.1 SEQ ID NO: 1 или белок, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97% или 98% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1 (функциональный белок дикого типа), при этом мутантный аллель имеет сниженную или отсутствующую экспрессию, либо при этом мутантный аллель кодирует мутантный WAP7.1 белок, содержащий одну или несколько аминокислот, которые заменены, вставлены и/или делетированы по сравнению с белком дикого типа.

В одном воплощении одна или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций включают в себя или состоят из замены, вставки или делеции одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких из четырех консервативных доменов. Мутантный белок имеет сниженную или отсутствующую функцию по сравнению с белком дикого типа (и, таким образом, по сравнению с растением дикого типа, содержащим ген WAP7.1 дикого типа), предпочтительно растительная клетка или

растение, содержащее мутантный аллель в гомозиготной форме, является факультативно партенокарпическим.

При указании по тексту настоящего документа на конкретное положение нуклеотида или аминокислоты, например, на аминокислоту 1054 SEQ ID NO: 1, «или на аминокислоту 1054 последовательности, включающей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO» (или «в эквивалентном положении в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%...»), это означает, что нуклеотид или аминокислота присутствует в вариантной последовательности в нуклеотиде или аминокислоте, соответствующей тому же нуклеотиду или аминокислоте (например, соответствующей аминокислоте 1054 SEQ ID NO: 1) в вариантной последовательности, т.е. в последовательности, по мере появления, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности по последовательности с указанной SEQ ID NO. Например, вариантная последовательность может быть на один или несколько 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 1045 в SEQ ID NO: 8 или аминокислота 1082 в SEQ ID NO; 9, что соответствует аминокислоте 1054 SEQ ID NO: 1 (см. фигуру 3).

Мутантный аллель представляет собой мутацию в эндогенном гене культурного арбуза. Существование гена, отвечающего за факультативную партенокарпию, позволяет специалисту в данной области создавать другие *новые* мутанты в гене, т.е. в любой культивируемой линии или разновидности.

Квалифицированный специалист может без особых усилий получить растения согласно изобретению, например, путем осуществления способа получения и/или идентификации мутантов WAP7.1 в мутантной популяции или путем целенаправленного редактирования гена WAP7.1.

Как уже упоминалось выше, поскольку было установлено, что ген WAP7.1 представляет собой ген, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 (белок арбуза дикого типа) в нормальных, непартенокарпических растениях арбуза, то можно получить такие же или другие мутанты по сравнению с теми *новыми*, которые были созданы изобретателями.

Поскольку в функциональных белках WAP7.1 дикого типа могут существовать естественные разновидности, белок WAP7.1 дикого типа не обязательно должен быть на

100% идентичен белку SEQ ID NO: 1, но при этом может иметь меньшую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, например, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5% или 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% при попарном выравнивании по всей длине с SEQ ID NO: 1. В аспекте одного консервативный домен связывания Zn и/или консервативный домен связывания пептид, и/или консервативный домен Plus3, и/или консервативный домен связывания пролина, все же на 100% идентичен этой SEQ ID NO: 1, так что изменение, по меньшей мере, на 94% идентичности лежит за пределами одного или нескольких, или же всех консервативных доменов. В еще одном аспекте изменение, по меньшей мере, 94% идентичности последовательности в функциональных белках дикого типа SEQ ID NO: 1 находится между доменом 3Plus и мотивом связывания пролина и/или после мотива связывания пролина (в С-концевой части белка).

Как уже упоминалось ранее, мутантный аллель гена, кодирующего белок WAP7.1, 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 WAP7.1, 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 WAP7.1, представляет собой точечную мутацию. Мутация может происходить в последовательности ДНК, содержащей кодирующую последовательность гена, кодирующего белок WAP7.1, или в последовательности РНК, кодирующей белок WAP7.1, или может происходить в аминокислоте белка WAP7.1. Что касается последовательности ДНК гена, кодирующего белок WAP7.1, 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 WAP7.1. Что касается РНК, кодирующей белок WAP7.1, 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 на С-терминальном конце белка или в одном или более консервативных доменах белка. Например, усечение белка приводит к удалению, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 150, 200 или более аминокислот С-терминального конца белка дикого типа приведет к образованию мутантного белка, который вызывает факультативную партенокарпию, как это было показано мутантным белком W1054STOP.

Аналогичным образом, мутации, при которых любой из консервативных доменов полностью или частично удален или заменен на одну или несколько других аминокислот, приведут к потере или уменьшению функции белка.

Например, мутация стоп-кодона, т.е. в N-концевой части, предшествующей любому из консервативных доменов, или в одном из консервативных доменов, приводит к появлению укороченного белка с уменьшенной функцией или с ее потерей.

Аналогичным образом аминокислотные вставки, делеции или замены в N-концевой части, предшествующей любому из консервативных доменов, или в одном из консервативных доменов могут привести к уменьшению или потере функции белка.

Любой мутантный аллель можно проанализировать на фенотип, если аллель находится в гомозиготной форме, например, диплоидные растения, чтобы посмотреть, действительно ли растение становится факультативным партенокарпом.

Таким образом, один вариант осуществления изобретения относится к растительным клеткам или растениям по изобретению, содержащим мутантный аллель гена, кодирующего белок WAP7.1, отличающийся тем, что этот мутантный аллель содержит или реализует одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из следующего

- a) делеция, укорочение, вставка, точечная мутация, нонсенс-мутация, миссенс-мутацию или несинонимическая мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация со сдвигом рамки считывания в геномной последовательности;
- b) мутация в одной или нескольких регуляторных последовательностях;
- c) делеция, укорочение, вставка, точечная мутация, нонсенс-мутация, миссенс-мутация или несинонимическая мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация со сдвигом рамки считывания в кодирующей последовательности;
- d) делеция, укорочение, вставка, точечная мутация, нонсенс-мутация, миссенс-мутация или несинонимическая мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация со сдвигом рамки считывания в пре-мРНК или мРНК; и/или

е) делеция, укорочение, вставка или замена одной или нескольких аминокислот в белке WAP7.1.

В одном аспекте наличие мутантного аллеля приводит к пониженной экспрессии или к отсутствию экспрессии гена WAP7.1, или же мутантный аллель кодирует белок с пониженной функцией или с потерей функции.

Пониженная экспрессия или отсутствие экспрессии указывает на наличие мутации в регуляторной области гена WAP7.1, такой как промотор, в результате чего образуется уменьшенный транскрипт мРНК или отсутствует транскрипт мРНК аллеля WAP7.1 по сравнению с растениями и растительными частями, содержащими аллель WAP7.1 дикого типа. Снижение экспрессии можно, например, определить путем измерения количества транскриптов мРНК, кодирующих белок WAP7.1, 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%, в некоторых случаях, 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 WAP7.1 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 несколько аминокислот вставлены, удалены или замещены по сравнению с белком WAP7.1 дикого типа SEQ ID NO: 1 или белок WAP7.1 дикого типа, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97% или 98% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, 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 WAP7.1 дикого типа содержит консервативный домен связывания Zn. Таким образом, в одном аспекте мутантный аллель представляет собой мутантный аллель гена WAP7.1, ген которого кодирует белок дикого типа SEQ ID NO: 1 (арбуз) или белок дикого типа, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97% или 98% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, и при этом белок дикого типа содержит консервативный домен связывания Zn из аминокислот с 114 по 159 SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте белок WAP7.1 дикого типа содержит консервативный домен связывания пептида. Таким образом, в одном аспекте мутантный аллель представляет собой мутантный аллель гена WAP7.1, ген которого кодирует белок дикого типа SEQ ID NO: 1 (арбуз) или белок дикого типа, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97% или 98% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, и при этом белок дикого типа содержит консервативный домен связывания пептида из аминокислот с 350 по 395 SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте белок WAP7.1 дикого типа содержит консервативный домен Plus3. Таким образом, в одном аспекте мутантный аллель представляет собой мутантный аллель гена WAP7.1, ген которого кодирует белок дикого типа SEQ ID NO: 1 (арбуз) или белок дикого типа, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97% или 98% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, и при этом белок дикого типа содержит консервативный домен Plus3 из аминокислот с 464 по 572 SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте белок WAP7.1 дикого типа содержит консервативный мотив связывания пролина. Таким образом, в одном аспекте мутантный аллель представляет собой мутантный аллель гена WAP7.1, ген которого кодирует белок дикого типа SEQ ID NO: 1 (арбуз) или белок дикого типа, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97% или 98% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, и при этом белок дикого типа содержит консервативный мотив связывания пролина из аминокислот с 812 по 828 SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте белок WAP7.1 дикого типа содержит консервативный домен связывания Zn и домен связывания пептида, а также домен Plus3 и мотив связывания пролина, т.е. любая разновидность функционального белка дикого типа находится за пределами этих консервативных доменов.

Мутантные аллели вышеуказанных аллелей дикого типа представляют собой в одном аспекте мутантные аллели со сниженной экспрессией или без нее (в результате, например, мутаций в промоторных или энхансерных элементах) или продуцирующие мутантный белок, который содержит одну или несколько вставленных, делетированных или замененных аминокислот по сравнению с белком дикого типа, в результате чего 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 дикого типа *WAP7.1*, 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 обнаружено, что домен связывания Zn, домен связывания пептида, домен Plus3 и мотив связывания пролина являются консервативными белковыми доменами, которые, скорее всего, будут на 100% идентичны в других функциональных вариантах *WAP7.1* дикого типа, поскольку они будут необходимы для правильного функционирования белка в растении. Следовательно, мутация одного или нескольких консервативных доменов путем вставки, удаления или замены одной или нескольких его аминокислот снизит или отменит функцию белка *WAP7.1 in vivo*.

Таким образом, в одном аспекте представленное в настоящем документе растение содержит мутантный аллель *WAP7.1*, который кодирует белок *WAP7.1*, содержащий одну или несколько аминокислот, вставленных, удаленных или замененных в домене связывания Zn, домене связывания пептида, домене Plus3 и/или в мотиве связывания пролина.

Функциональный белок *WAP7.1* дикого типа, который мутирован и содержит одну или несколько вставленных, замененных или делетированных аминокислот, выбирают из *CIWAP7.1* SEQ ID NO: 1 или белка, по меньшей мере, на 94% идентичного SEQ ID NO: 1, при этом белок дикого типа содержит домен связывания Zn, домен связывания пептида, домен Plus3 и/или мотив связывания пролина SEQ ID NO: 1.

Мутантный белок, содержащий сдвиг рамки, приводящий к замене одной или нескольких аминокислот в любом одном из консервативных доменов, или мутантный белок, содержащий усечение, ведущее к делеции одной или нескольких аминокислот любого одного из консервативных доменов, рассматривается в рамках настоящего документа как мутантный белок со сниженной или отсутствующей функцией *in vivo*.

В одном аспекте, таким образом, представлен мутантный аллель *CIWAP7.1*, кодирующий мутантный белок, причем W1054 SEQ ID NO: 1 (или последовательность,

содержащая, по меньшей мере, 94% идентичности с SEQ ID NO: 1), замещена другой аминокислотой или удалена, например, кодон замещается СТОП-кодоном.

В одном аспекте, таким образом, представлен мутантный аллель CIWAP7.1, кодирующий мутантный белок, причем R346 SEQ ID NO: 1 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 94% идентичности с SEQ ID NO: 1), замещена другой аминокислотой или удалена, например, кодон замещается СТОП-кодоном.

В одном аспекте, таким образом, представлен мутантный аллель CIWAP7.1, кодирующий мутантный белок, причем S324 SEQ ID NO: 1 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 94% идентичности с SEQ ID NO: 1), замещена другой аминокислотой или удалена, например, кодон замещается СТОП-кодоном.

В одном аспекте, таким образом, представлен мутантный аллель CIWAP7.1, кодирующий мутантный белок, причем P830 SEQ ID NO: 1 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 94% идентичности с SEQ ID NO: 1), замещена другой аминокислотой или удалена, например, кодон замещается СТОП-кодоном.

В одном аспекте, таким образом, представлен мутантный аллель CIWAP7.1, кодирующий мутантный белок, причем A328 SEQ ID NO: 1 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 94% идентичности с SEQ ID NO: 1), замещена другой аминокислотой или удалена, например, кодон замещается СТОП-кодоном.

В одном аспекте, таким образом, представлен мутантный аллель CIWAP7.1, кодирующий мутантный белок, причем Q373 SEQ ID NO: 1 (или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 94% идентичности с SEQ ID NO: 1), замещена другой аминокислотой или удалена, например, кодон замещается СТОП-кодоном.

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

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 «замещение» 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 *wap7.1*, могут быть растениями семейства *Cucurbitaceae*, особенно культивируемыми видами, такими как арбуз (*Citrullus lanatus*). Также сюда относятся растения и части растений семейства *Cucurbitaceae*, особенно арбуз, содержащие две копии мутантного аллеля *wap7.1*, при этом диплоидные растения, содержащие две копии мутантного аллеля *wap7.1*, приводят к появлению растений, демонстрирующих фенотип факультативной партенокарпии.

В одном аспекте мутантный аллель *wap7.1* является гетерозиготным в диплоидной клетке растения или в растении, например, в диплоидном растении арбуза. В еще одном аспекте мутантный аллель *wap7.1* является гомозиготным в диплоидной клетке растения или растении.

Растительные клетки и растения предпочтительно представляют собой культивируемые растения, такие как элитные селекционные линии или сорта, а не дикие растения. Арбуз может быть представлен любой разновидностью арбуза.

Растения арбуза и их части, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *wap7.1*, 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 *wap7.1*, можно использовать, например, для получения октаплоида путем удвоения хромосом. Скрещивание такого октоплоида с диплоидом, гомозиготным по аллелю *wap7.1*, дает пентаплоид, состоящий из пяти копий аллеля *wap7.1*. В одном аспекте полиплоидный арбуз содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *wap7.1*, но также может содержать большее количество копий, например, в предпочтительном аспекте триплоидное растение содержит две или три копии мутантного аллеля *wap7.1*, а тетраплоид содержит две или четыре копии мутантного аллеля *wap7.1*.

Растения арбуза и их части, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *wap7.1*, 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 *wap7.1*, можно использовать, например, для получения октаплоида путем удвоения хромосом. Скрещивание такого октоплоида с диплоидом, гомозиготным по аллелю *wap7.1*, дает пентаплоид, состоящий из пяти копий аллеля *wap7.1*. В одном аспекте полиплоидный арбуз содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *wap7.1*, но также может содержать большее количество копий, например, в предпочтительном аспекте

триплоидное растение содержит две или три копии мутантного аллеля $wap7.1$, а тетраплоид содержит две или четыре копии мутантного аллеля $wap7.1$.

Таким образом, диплоидное растение может иметь генотип $wap7.1/WAP7.1$ (гетерозиготный по мутантному аллелю) или $wap7.1/wap7.1$ (гомозиготный по мутантному аллелю). В одном аспекте диплоидное растение, содержащее аллель $wap7.1$ в гомозиготной форме, представляет собой двойное гаплоидное растение (ДГ), например, двойное гаплоидное растение арбуза, 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 $wap7.1/WAP7.1/WAP7.1$ или $wap7.1/wap7.1/wap7.1$ или $wap7.1/wap7.1/wap7.1$. Триплоидное растение с генотипом $wap7.1/WAP7.1/WAP7.1$ может быть получено путем скрещивания тетраплоидного женского растения дикого типа ($WAP7.1/WAP7.1/WAP7.1/WAP7.1$) с диплоидным мужским растением, которое является гомозиготным по мутантному аллелю ($wap7.1/wap7.1$). Триплоидное растение с генотипом $wap7.1/wap7.1/WAP7.1$ может быть получено путем скрещивания тетраплоидного женского растения ($wap7.1/wap7.1/wap7.1/wap7.1$) с диплоидным мужским растением, которое является гомозиготным по аллелю дикого типа ($WAP7.1/WAP7.1$).

Тетраплоидное растение арбуза может иметь генотип $wap7.1/WAP7.1/WAP7.1/WAP7.1$ или $wap7.1/wap7.1/wap7.1/WAP7.1$, или $wap7.1/wap7.1/wap7.1/wap7.1$, или $wap7.1/wap7.1/wap7.1/wap7.1$. Генотипы $wap7.1/wap7.1/wap7.1/WAP7.1$ можно получить путем удвоения хромосом диплоида $wap7.1/WAP7.1$. Генотипы $wap7.1/wap7.1/wap7.1/wap7.1$ можно получить путем удвоения хромосом диплоида $wap7.1/wap7.1$. Два других генотипа – $wap7.1/WAP7.1/WAP7.1/WAP7.1$ и $wap7.1/wap7.1/wap7.1/wap7.1$ – можно, например, получить путем скрещивания двух тетраплоидов генотипа $wap7.1/wap7.1/wap7.1/WAP7.1$ и определения генотипов в рамках потомства.

В одном аспекте растение арбуза гомозиготно по аллелю $wap7.1$, в другом аспекте оно гетерозиготно по $wap7.1$. 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, 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, содержащие мутант аллеля *war7.1*

В одном аспекте растение арбуза представляет собой диплоидную линию (например, инбредную линию) или сорт, имеющий, по меньшей мере, одну мутантную копию аллеля *war7.1*, предпочтительно две мутантные копии (т.е. гомозиготные по аллелю *war7.1*). При предотвращении опыления женских цветков диплоидное растение, гомозиготное по аллелю *war7.1*, 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 *war7.1*, 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 *war7.1* на хромосоме 7.

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 7 мутантный ген *war7.1* в гомозиготной форме (*war7.1/war7.1*), 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 *war7.1* 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 *war7.1* 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 семяпочек 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 7 ген *war7.1* в гомозиготной форме (*war7.1/war7.1*) 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 *war7.1* 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 *war7.1*, 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 *war7.1*, как описано выше в Таблице 1, или другой мутантный аллель *war7.1*.

В одном аспекте диплоидное растение содержит две копии мутантного аллеля *war7.1*, который кодирует усеченный белок SEQ ID NO: 2 из-за СТОП-кодона на аминокислоте 1054 SEQ ID NO: 1, или который кодирует усеченный белок, содержащий СТОП-кодон на эквивалентном кодоне аминокислоты в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте диплоидное растение содержит две копии мутантного аллеля *war7.1*, который кодирует усеченный белок SEQ ID NO: 10 из-за СТОП-кодона на аминокислоте 373 SEQ ID NO: 1, или который кодирует усеченный белок, содержащий СТОП-кодон на эквивалентном кодоне аминокислоты в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте диплоидное растение содержит две копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 11, содержащий К на аминокислоте 346, или который кодирует мутантный белок, содержащий К в эквивалентном положении в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

В одном аспекте диплоидное растение содержит две копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 12, содержащий N на аминокислоте 324, или который кодирует мутантный белок, содержащий N в эквивалентном положении в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

В одном аспекте диплоидное растение содержит две копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 13, содержащий S на аминокислоте 830, или который кодирует мутантный белок, содержащий S в эквивалентном положении в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13.

В одном аспекте диплоидное растение содержит две копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 14, содержащий T на аминокислоте 328, или который кодирует мутантный белок, содержащий T в эквивалентном положении в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14.

В одном аспекте диплоидное растение содержит две копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует мутантный белок Таблицы 1.

В одном аспекте диплоидное растение содержит две копии мутантного аллеля *wap7.1* SEQ ID NO: 7.

Тетраплоидные растения арбуза, содержащие мутантный аллель *wap7.1*

Получение триплоидных арбузов без косточек предусматривает использование пыльцы диплоидных мужских родительских растений для опыления цветков тетраплоидных материнских растений. Опыление тетраплоидных цветков диплоидной пыльцой 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 *war7.1*, 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 *war7.1* для использования в качестве женского родителя, и диплоидные растения, содержащие предпочтительно две копии рецессивного аллеля *war7.1* для использования в качестве мужского родителя, а также триплоидные гибриды F1 (содержащие предпочтительно три копии мутантного аллеля *war7.1*), 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 *war7.1*, 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 *war7.1* (как указано выше), по одному на каждой из четырех хромосом 5.

Все варианты осуществления, описанные для мутантного аллеля *wap7.1* выше в равной степени относятся к тетраплоиду. Таким образом, например, тетраплоидное растение может состоять из четырех копий одного аллеля *wap7.1*, описанного в Таблице 1, или четыре копии другого мутантного аллеля *wap7.1*, 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 *WAP7.1*, кодирующего белок SEQ ID NO: 1, или белок, имеющий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97% или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Аспекты, касающиеся мутантного аллеля *wap7.1*, описанного выше применительно к диплоидным растениям арбуза, содержащим одну или две копии мутантного аллеля *wap7.1*, применимы к тетраплоидным растениям и частям растений. Так, например, в одном аспекте мутантный аллель приводит к снижению или отсутствию экспрессии гена *WAP7.1*, либо мутантный аллель кодирует мутантный белок *WAP7.1* со сниженной или отсутствующей функцией.

В одном аспекте тетраплоидное растение содержит две или предпочтительно четыре копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 2.

В одном аспекте тетраплоидное растение содержит две или предпочтительно четыре копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует усеченный белок SEQ ID NO: 2 из-за СТОП-кодона на аминокислоте 1054 SEQ ID NO: 1, или который кодирует усеченный белок, содержащий СТОП-кодон на эквивалентном кодоне аминокислоты в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте тетраплоидное растение содержит две или предпочтительно четыре копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует усеченный белок SEQ ID NO: 10 из-за СТОП-кодона на аминокислоте 373 SEQ ID NO: 1, или который кодирует усеченный белок, содержащий СТОП-кодон на эквивалентном кодоне аминокислоты в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте тетраплоидное растение содержит две или предпочтительно четыре копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 11, содержащий К на аминокислоте 346, или который кодирует мутантный белок, содержащий К в эквивалентном положении в последовательности, содержащей, по

меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

В одном аспекте тетраплоидное растение содержит две или предпочтительно четыре копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 12, содержащий N на аминокислоте 324, или который кодирует мутантный белок, содержащий N в эквивалентном положении в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

В одном аспекте тетраплоидное растение содержит две или предпочтительно четыре копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 13, содержащий S на аминокислоте 830, или который кодирует мутантный белок, содержащий S в эквивалентном положении в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13.

В одном аспекте тетраплоидное растение содержит две или предпочтительно четыре копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует мутантный белок SEQ ID NO: 14, содержащий T на аминокислоте 328, или который кодирует мутантный белок, содержащий T в эквивалентном положении в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14.

В еще одном аспекте тетраплоидное растение содержит две или четыре копии мутантного аллеля *wap7.1*, который кодирует мутантный белок Таблицы 1.

В одном аспекте тетраплоидное растение содержит две или предпочтительно четыре копии мутантного аллеля *wap7.1* SEQ ID NO: 7.

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 ОНП, т.е. растения или части, содержащие AAAA для маркера mWM23348403 в нуклеotide 51 SEQ ID NO: 5 (обнаружение четырех мутантных аллелей *wap7.1*, кодирующих белок SEQ ID NO: 2, содержащий мутацию W1054STOP), можно отличить от растений или частей, содержащих GAAA (обнаружение трех мутантных аллелей, кодирующих белок SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 10), CCTT (обнаружение двух мутантных аллелей, кодирующих белок SEQ ID NO: 2), GGG A (обнаружение одной мутантной аллели, кодирующей белок SEQ ID NO: 2) или

GGGG (обнаружение четырех аллелей дикого типа, кодирующих белок SEQ ID NO: 1) для mWM23348403 в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 в их геноме. То же самое относится и к другим аллель-специфическим маркерам, таким как, например, маркеры ОНП из таблицы 1.

В одном аспекте изобретения предусмотрен тетраплоидный арбуз, имеющий, по меньшей мере, одну, или две, или три копии мутантного аллеля war7.1 (как указано выше), но предпочтительно содержащий четыре копии мутантного аллеля war7.1 (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 war7.1 для удвоения хромосом и получения тетраплоидного растения. Например, диплоидную инбредную линию, которая является гомозиготной по war7.1, можно использовать для получения тетраплоидного растения.

Тетраплоидное растение, включающее в себя четыре копии мутантного аллеля war7.1, 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 war7.1, как описано выше.

Тетраплоид может включать в себя различные мутантные аллели war7.1, например, два мутантных аллеля war7.1, кодирующих укороченный белок WAP7.1 и два мутантных аллеля war7.1, кодирующих белок WAP7.1, имеющий аминокислотную замену. Такие растения можно получить, например, путем получения сначала диплоида, содержащего различные мутантные аллели war7.1, а затем обеспечив удвоение хромосом такого диплоида. Однако в одном аспекте тетраплоид содержит четыре копии одного и того же

мутантного аллеля *wap7.1*, то есть тетраплоид происходит от диплоида, гомозиготного по аллелю *wap7.1*.

Триплоидные растения арбуза, содержащие мутантные аллели *wap7.1*

Еще в одном аспекте предусмотрены триплоидные семена арбуза, растения и части растений, содержащие одну, две или три копии мутантного аллеля *wap7.1*, т.е. *wap7.1 /WAP7.1/WAP7.1* или *wap7.1 /wap7.1 /WAP7.1* или соответственно *wap7.1 /wap7.1 /wap7.1*. 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>Wap7.1 / wap7.1 / wap7.1 / wap7.1</i>	<i>Wap7.1 / wap7.1</i>	<i>Wap7.1 / wap7.1 / wap7.1</i>
B	<i>Wap7.1 / wap7.1 / wap7.1 / wap7.1</i>	<i>WAP7.1/WAP7.1</i>	<i>Wap7.1 / wap7.1 /WAP7.1</i>
C	<i>WAP7.1/ WAP7.1/ WAP7.1/ WAP7.1</i>	<i>Wap7.1 / wap7.1</i>	<i>WAP7.1/WAP7.1/ wap7.1</i>

В одном аспекте тетраплоидное растение, содержащее четыре копии мутантного аллеля *wap7.1*, используется в качестве материнского растения и опыляется пыльцой диплоидного мужского растения-родителя, содержащего две копии мутантного аллеля *wap7.1*, а семена от скрещивания собирают. Эти семена триплоидны и содержат три копии мутантного аллеля *wap7.1* по изобретению (таблица 2, строка A). 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 *war7.1*, 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 *war7.1*. Например, женский родитель может содержать четыре мутантных аллеля *war7.1*, кодирующих усеченный белок *WAP7.1*, а мужской родитель может содержать два мутантных аллеля *war7.1*, кодирующих белок *WAP7.1* с аминокислотной заменой.

В одном аспекте мутантный аллель *war7.1*, 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 *war7.1* 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 *war7.1*, например, по три мутантных копии *wor1* и *war7.1* в триплоидном арбузе, или одна или две мутантные копии *wor1* и три мутантные копии *war7.1* 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 *war7.1* 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 *war7.1* 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 *war7.1* 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 *war7.1* 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) *war7.1* 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 war7.1 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 war7.1, 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 war7.1 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 *war7.1* и тетраплоидного растения, содержащего четыре копии мутантного аллеля *war7.1* (см., например, таблицу 2, строка В), или получение диплоидного растения арбуза, гомозиготного по мутантному аллелю *war7.1* и тетраплоидное растение без мутантного аллеля *war7.1* (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 *war7.1*, как указано выше.

Также предусмотрен способ выращивания триплоидных растений, содержащих, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *war7.1*. 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 *war7.1*, 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 *war7.1* 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 по наличию мутантного аллеля *war7.1* и/или фенотипически. Наличие одного или более мутантных аллелей *war7.1* 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 *war7.1*. Как указано выше, клеточная или тканевая культура включает в себя клетки или протопласты или растительную ткань из растительной части растения, содержащего мутантный аллель *war7.1*, 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, регенерированное из такой клеточной или тканевой культуры, причем регенерированное растение (или его потомство, например, полученное после самоопыления регенерированного растения) содержит мутантный

аллель war7.1. Следовательно, в одном аспекте растение арбуза, содержащее одну или более копий мутантного аллеля war7.1, представляет собой вегетативно размножающееся растение арбуза.

В другом аспекте клетки и ткани по изобретению (а также, при необходимости, клеточные или тканевые культуры), содержащие одну или более копий war7.1 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 war7.1,
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 war7.1 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 *war7.1*. При необходимости, для различения плодов выполняется обнаружение мутантного аллеля *war7.1*, например, путем обнаружения мутантного аллеля *war7.1* 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 *war7.1* 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. *war7.1/WAR7.1/WAR7.1* или *war7.1/war7.1/war7.1* или *war7.1/war7.1/war7.1*), 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 *WAR7.1*;
- c) при необходимости, проверку того, содержит ли растение, выбранное в соответствии с подпунктом b), мутантный аллель гена *WAR7.1*; а также
- d) при необходимости, выращивание растений, полученных на этапе c).

Предусмотрено получение растения арбуза указанным выше способом.

Популяция растений арбуза согласно подпункту a) предпочтительно представляет собой один генотип культивируемой селекционной линии или сорта арбуза, который обработан/был обработан (или подвергался 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 WAP7.1, т.е. аллеля, который либо имеет сниженную или отсутствующую экспрессию белка WAP7.1 дикого типа или аллеля, кодирующего мутантный белок WAP7.1. 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 визуальнo 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 семянными при опылении (факультативная партенокарпия). В том, что касается скрининга растений на наличие мутантного аллеля гена WAP7.1, то его можно выполнять различными методами для выявления ДНК, РНК или белка wap7.1, 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 wap7.1. Например, можно провести маркерный анализ или анализ последовательности участка хромосомы, содержащего локус WAP7.1, или использовать ПЦР или ОТ-ПЦР для амплификации аллеля wap7.1 (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 wap7.1 для получения факультативных партенокарпических растений арбуза и/или бессемянных плодов арбуза в отсутствие опыления женских цветков. Аналогичным образом настоящим документом предусмотрено использование мутантного аллеля wap7.1 гена WAP7.1 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 *wap7.1* не является трансгенным растением, т.е. отбирают нетрансгенное потомство, которое не содержит, например, систему CRISPR.

В одном аспекте мутантный аллель гена *WAP7.1* 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 *WAP7.1* в арбузе 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 *WAP7.1* и выделенный белок *WAP7.1* дикого типа или выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая мутантный белок *WAP7.1* или белок *WAP7.1* дикого типа. Также настоящим документом предусмотрено антитело, способное связываться с мутантным белком *WAP7.1* 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 *WAP7.1*.

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, семян или растительного материала, или частей растения, или ДНК, или РНК, или полученного из них белка на наличие мутантного аллеля *wap7.1* обеспечивается за счет одного или более следующих этапов:

- a) определение наличия сниженной или отсутствующей экспрессии эндогенного гена *WAP7.1*;
- b) определение сниженного количества или отсутствующего белка *WAP7.1* дикого типа;
- c) определение наличия мутантной мРНК, кДНК или геномной ДНК, кодирующей мутантный белок *WAP7.1*;
- d) определение наличия мутантного белка *WAP7.1*;
- e) 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, 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) (как, например, показано в Таблице 1), 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, 50, 60 или 70 предшествующих пар оснований и 50, 60 или 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 mWM23348403 в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 или в нуклеотиде 51 последовательности, которая, по меньшей мере, на 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % или более идентична последовательности SEQ ID NO: 5, можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия мутантного аллеля war7.1, кодирующий мутантный белок, содержащий мутацию W1054STOP в арбузе. 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 (например, приведенных в Таблице 1 и др.)

В настоящем документе также предусмотрен способ идентификации растения арбуза (или части растения), содержащего мутантный аллель war7.1, способ, включающий обнаружение в растении (или части растения) мутантного аллеля war7.1, причем наличие определяется, по меньшей мере, одним маркером в пределах аллеля war7.1 или путем обнаружения белка, кодируемого аллелем war7.1. Способ обнаружения мутантного аллеля war7.1 выбирают из группы, состоящей из ПЦР-амплификации, секвенирования нуклеиновых кислот, гибридизации нуклеиновых кислот и анализа на основе антител (например, иммуноанализа) для обнаружения белка war7.1, кодируемого аллелем.

В настоящем документе также предусмотрен способ идентификации растения арбуза (или части растения), содержащего мутантный аллель war7.1, включающий мутацию в регуляторном элементе, причем такой способ включает в себя обнаружение в растении (или части растения) сниженной или отсутствующей экспрессии гена мутантного аллеля war7.1, причем присутствие определяют по уровням мРНК (кДНК) аллеля WAR7.1 дикого типа или по уровням белка WAR7.1 дикого типа. Способ обнаружения мутантного аллеля war7.1 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 WAR7.1, кодируемого аллелем.

Также настоящим документом предусмотрен способ определения, обнаружения или анализа на предмет наличия в клетке, растении или части растения арбуза мутантного

аллеля гена WAP7.1, кодирующего белок SEQ ID NO: 1, или белок, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97% или 98% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1. 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.

Для определения наличия в растении или его части мутантного аллеля war7.1 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 mWM23348403.

Способ селекции растения или семян, включающий следующие этапы:

- a) идентификацию растения или семени, которое имеет мутацию в аллеле гена, кодирующего белок WAP7.1, причем аллель гена дикого типа кодирует белок WAP7.1, который, по меньшей мере, на 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен любому из белков, выбранных из группы: SEQ ID NO:1, 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, 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 *wap7.1*,
- c) при необходимости, проверку наличия в отобранном растении согласно b), мутации в аллеле, кодирующем белок WAP7.1, и, при необходимости,
- d) выращивание или культивирование растения или семян, полученных в соответствии с этапом c),

причем аллель гена дикого типа кодирует белок WAP7.1, который, по меньшей мере, на 94% идентичен любому из белков, выбранных из группы: SEQ ID NO:1.

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 WAP7.1;
 - ii) молекулы ДНК, которые за счет ко-супрессивного эффекта приводят к снижению экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок WAP7.1;
 - iii) молекулы ДНК, кодирующие, по меньшей мере, один рибозим, расщепляющий специфические транскрипты эндогенного гена, кодирующего белок WAP7.1;
 - 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 WAP7.1 (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 WAP7.1, причем мутация или вставка вызывает снижение экспрессии гена, кодирующего белок WAP7.1, или приводит к синтезу белка WAP7.1 с отсутствующей или сниженной функцией;

- vi) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело, при этом антитело приводит к снижению активности эндогенного гена, кодирующего белок WAP7.1, вследствие связывания антитела с эндогенным белком WAP7.1;
- vii) молекулы ДНК, которые содержат транспозоны, при этом интеграция этих транспозонов приводит к мутации или вставке в эндогенный ген, кодирующий белок WAP7.1, что приводит к снижению экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок WAP7.1, или синтезу неактивного белка;
- viii) молекулы Т-ДНК, которые в результате вставки в эндогенный ген, кодирующий белок WAP7.1, вызывают снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок WAP7.1, или приводят к синтезу отсутствующей или сниженной функции белка WAP7.1;
- 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 WAP7.1, 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 WAP7.1, например, путем подавления эндогенного гена WAP7.1. Таким растением может являться любое растение, в одном аспекте это арбуз. Тем не менее, им

также может являться огурец, дыня, перец, кукуруза, соя, пшеница, рапс, помидоры, хлопок и т.д.

В еще одном аспекте предусмотрено растение и часть растения, содержащая мутацию в эндогенном гене WAP7.1, например, индуцированную мутацию, например, за счет направленного мутагенеза, при котором экспрессия гена снижается или отсутствует, либо экспрессируемый ген кодирует сниженную функцию белка WAP7.1 или ее отсутствие по сравнению с белком дикого типа. Таким растением может быть любое растение, в одном аспекте это арбуз. Тем не менее, в данном качестве также может выступать огурец, дыня, кукуруза, соя, пшеница, рапс, помидоры, хлопок, перец и т.д. Поскольку ген WAP7.1 у других видов может иметь меньшую идентичность последовательности с геном WAP7.1 арбуза, в данном аспекте изобретения ген WAP7.1 представляет собой ген, кодирующий белок, последовательность которого идентична, по меньшей мере, на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 94%, 95% с SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях ген WAP7.1 представляет собой ген, кодирующий белок, содержащий, по меньшей мере, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 94%, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, при этом данный белок содержит консервативный домен связывания Zn домен, домен связывания пептида, домен Plus3 и/или мотив связывания пролина SEQ ID NO: 1, или домен связывания Zn, домен связывания пептида, домен Plus3 и/или мотив связывания пролина, содержащие, по меньшей мере, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% идентичности последовательности домена связывания Zn, домена связывания пептида, домена Plus3 и/или мотива связывания пролина SEQ ID NO: 1. Специалист в данной области может идентифицировать ортологи гена WAP7.1 у таких других видов, например, дыни и огурца, перца или томата, и таким образом получить факультативные партенокарпические растения дыни, огурца, перца или томата. Все варианты осуществления, описанные в настоящем документе для арбуза, в равной степени применимы к другим видам сельскохозяйственных культур, с той разницей, что ген WAP7.1, таким образом, может кодировать белок с менее чем 94% идентичностью последовательности с белком арбуза WAP7.1 дикого типа SEQ ID NO: 1.

Настоящим документом также предусмотрен способ скрининга растений арбуза, семян, частей растения или ДНК из них на наличие мутантного аллеля гена, именуемого WAP7.1, или селекции растения, семян или части растения арбуза, содержащего мутантный аллель гена WAP7.1, включающий следующие этапы:

- а) анализ наличия в геномной ДНК аллеля WAP7.1 дикого типа, который кодирует белок SEQ ID NO: 1 (или белок дикого типа, содержащий, по меньшей мере,

94% идентичности с SEQ ID NO: 1), и/или мутантного аллеля WAP7.1, который кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, замененных, вставленных или делетированных, по сравнению с белком WAP7.1 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 а) включает в себя способ, выбранный из:

- i) амплификации, по меньшей мере, части аллеля WAP7.1 с использованием одного или более олигонуклеотидных праймеров, которые гибридизуются с ДНК аллеля WAP7.1,
- ii) гибридизации одного или более олигонуклеотидных зондов, по меньшей мере, с частью ДНК аллеля WAP7.1,
- iii) секвенирования ДНК, мРНК или кДНК аллеля WAP7.1.

Так, например, образец ДНК может быть получен из растения, семени или части растения, а также может быть выполнена реакция ПЦР для амплификации части аллеля WAP7.1 дикого типа и/или части мутантного аллеля WAP7.1.

Например, можно использовать методы конкурентной ПЦР (такие как анализ KASP) для получения продуктов амплификации аллелей, присутствующих в локусе WAP7.1 в геномной ДНК. Аналогичным образом, олигонуклеотидные зонды могут генерировать продукты гибридизации аллелей, присутствующих в локусе WAP7.1 в геномной ДНК. Праймеры или зонды могут быть специфичными для конкретного аллеля WAP7.1, например, дифференцировать аллель дикого типа от мутантного аллеля. Например, маркер ОНП mWM23348403 содержит ОНП в нуклеотиде 51, который отличает аллель дикого типа, кодирующий белок, который содержит аминокислоту W1054, и мутантный аллель, кодирующий белок, который содержит преждевременный стоп-кодон для аминокислоты W1054. Праймеры или зонды могут быть предназначены обнаружения такого ОНП, и то же самое можно сделать для любого другого полиморфизма (например, ОНП или инсерционно-делеционная мутация), обнаруженного между аллелями дикого типа и мутантными аллелями WAP7.1, такими как аллели, указанные в Таблице 1.

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

a) обеспечения наличия геномной ДНК одного или нескольких растений арбуза или популяции растений, а также

b) выполнения анализа генотипирования, который выявляет присутствие аллеля дикого типа, кодирующего белок SEQ ID NO: 1 или аллель дикого типа, кодирующий белок, который, по меньшей мере, на 94% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, и/или присутствие мутантного аллеля (или двух разных мутантных аллелей), отличающегося тем, что мутантный аллель кодирует мутантный белок, который содержит одну или более аминокислот, вставленных, удаленных или замененных по сравнению с белком дикого типа SEQ ID NO: 1 или сравниваемых с белком дикого типа, имеющим, по меньшей мере, 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и в некоторых случаях

c) селекции 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 нескольких аминокислот по отношению к белку дикого типа, например, мутантный аллель кодирует один из мутантных белков WAP7.1, описанных в настоящем документе, например, в Таблице 1.

Так, например, генотип для аллеля, содержащего ОНП G/A (кодон AGG AAG; см. строку 1 в Таблице 1), который различает аминокислоту R в положении 346 в SEQ ID NO: 1 или аминокислоту R в эквивалентном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и аминокислоту K в положении 346 в SEQ ID NO: 1 или аминокислоту K в эквивалентном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, можно анализировать в вышеуказанном исследовании. Таким образом, в одном аспекте исследование может выявить, например, аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 (WAP7.1 дикого типа) и/или аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 11 (мутантный белок WAP7.1, содержащий замену R346K).

Также, например, генотип для аллеля, содержащего ОНП G/A (кодон AGC AAC; см. строку 2 в Таблице 1), который различает аминокислоту S в положении 324 в SEQ ID

NO: 1 или аминокислоту S в эквивалентном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и аминокислоту N в положении 324 в SEQ ID NO: 1 или аминокислоту N в эквивалентном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, можно анализировать в вышеуказанном исследовании. Таким образом, в одном аспекте исследование может выявить, например, аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 (WAP7.1 дикого типа) и/или аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 12 (мутантный белок WAP7.1, содержащий замену S324N).

Аналогичным образом, генотип для аллеля, содержащего ОНП С/Т (кодон ССТТСТ; см. строку 3 в Таблице 1), который различает аминокислоту Р в положении 830 в SEQ ID NO: 1 или аминокислоту Р в эквивалентном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и аминокислоту S в положении 830 в SEQ ID NO: 1 или аминокислоту S в эквивалентном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, можно анализировать в вышеуказанном исследовании. Таким образом, в одном аспекте исследование может выявить, например, аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 (WAP7.1 дикого типа) и/или аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 13 (мутантный белок WAP7.1, содержащий замену P830S).

Также генотип для аллеля, содержащего ОНП G/A (кодон GCAACA; см. строку 4 в Таблице 1), который различает аминокислоту А в положении 328 в SEQ ID NO: 1 или аминокислоту А в эквивалентном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и аминокислоту Т в положении 328 в SEQ ID NO: 1 или аминокислоту Т в эквивалентном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, можно анализировать в вышеуказанном исследовании. Таким образом, в одном аспекте исследование может выявить, например, аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 (WAP7.1 дикого типа) и/или аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 14 (мутантный белок WAP7.1, содержащий замену A328T).

Также генотип для аллеля, содержащего ОНП G/A (кодон TGGTGA; см. строку 5 в Таблице 1), который различает аминокислоту W в положении 1054 в SEQ ID NO: 1 или аминокислоту W в эквивалентном положении в белке дикого типа, содержащем, по

меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 и аллель, содержащий стоп-кодон для аминокислоты W в положении 1054 в SEQ ID NO: 1 или для аминокислоты W в эквивалентном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, можно анализировать в вышеуказанном исследовании. Таким образом, в одном аспекте исследование может выявить, например, аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 (WAP7.1 дикого типа) и/или аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 2 (мутантный белок WAP7.1, содержащий замену W1054*).

Также аналогичным образом, генотип для аллеля, содержащего ОНП С/Т (кодон СААТАА; см. строку 6 в Таблице 1), который различает аминокислоту Q в положении 373 в SEQ ID NO: 1 или аминокислоту Q в эквивалентном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 и аллель, содержащий стоп-кодон для аминокислоты Q в положении 373 в SEQ ID NO: 1 или для аминокислоты Q в эквивалентном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, можно анализировать в вышеуказанном исследовании. Таким образом, в одном аспекте исследование может выявить, например, аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 (WAP7.1 дикого типа) и/или аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 10 (мутантный белок WAP7.1, содержащий замену Q373*).

Очевидно, что в приведенном выше анализе также может быть обнаружено присутствие одного или двух мутантных аллелей, например, одна или две копии определенного мутантного аллеля, или двух разных мутантных аллелей. Так, например, в таком анализе может быть обнаружено присутствие аллеля, кодирующего белок SEQ ID NO: 11, и/или мутантного аллеля, кодирующего белок SEQ ID NO: 12. В описанном выше способе анализ может определять генотип любого аллеля WAP7.1, будь то аллель дикого типа и/или один или несколько мутантных аллелей.

Аллели дикого типа представляют собой, например, геномную ДНК в локусе WAP7.1 на хромосоме 7. Например, SEQ ID NO: 6 обеспечивает в настоящем документе наличие геномной ДНК, кодирующей белок WAP7.1 дикого типа, но также и геномные последовательности, включающие, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности SEQ ID NO: 6 могут

представлять собой последовательности геномной ДНК, кодирующие белки WAP7.1 дикого типа.

Таким образом, в одном аспекте один или несколько из следующих аллелей обнаруживаются на этапе b описанного выше способа:

- аллель WAP7.1 дикого типа, кодирующий белок SEQ ID NO: 1, или белок дикого типа, содержащий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1;
- мутантный аллель WAP7.1, кодирующий мутантный белок WAP7.1, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, замененных или удаленных по отношению к аллелю WAP7.1 дикого типа, кодирующему белок SEQ ID NO: 1, или белок дикого типа, содержащий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 (см. также в других местах по тексту настоящего документа);
- мутантный аллель WAP7.1, кодирующий мутантный белок WAP7.1, содержащий замену R346K в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном аминокислотном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1;
- мутантный аллель WAP7.1, кодирующий мутантный белок WAP7.1, содержащий замену S324N в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном аминокислотном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1;
- мутантный аллель WAP7.1, кодирующий мутантный белок WAP7.1, содержащий замену P830S в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном аминокислотном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1;
- мутантный аллель WAP7.1, кодирующий мутантный белок WAP7.1, содержащий замену A328T в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном аминокислотном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1;
- мутантный аллель WAP7.1, кодирующий мутантный белок WAP7.1, содержащий замену W1054* в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном аминокислотном положении в

белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1;

- мутантный аллель WAP7.1, кодирующий мутантный белок WAP7.1, содержащий замену Q373* в SEQ ID NO: 1 или в эквивалентном аминокислотном положении в белке дикого типа, содержащем, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

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, например, аллель дикого типа и мутантный аллель или проводят различия между двумя мутантными аллелями.

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 WAP7.1.

Можно применять различные анализы на генотипирование, если они позволяют обнаруживать инсерционно-делеционные мутации и ОНП, а также различать, например, аллель дикого типа, присутствующий в геномной ДНК (в локусе WAP7.1 на хромосоме 7), или один или несколько мутантных аллелей гена WAP7.1, 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 VHQplus 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 BHQPlus (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 RNКазе H2-зависимой ПЦР, генотипировании BHQplus, генотипировании BHQplex CoPrimer и ряд других.

Анализ KASP 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, включенные 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 (ОНП) или вставок и делеций (инсерционно-делеционные мутации). Технология KASP подходит для использования на различных платформах оборудования и обеспечивает гибкость в части количества ОНП 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.

Анализы генотипирования TaqMan также описаны в работе Woodward J. ‘Bi-allelic SNP genotyping using the TaqMan® assay.’ *Methods Mol Biol.* 2014; 1145:67-74, US5210015 и US5487972, включенные сюда в качестве 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, например, одного или нескольких аллелей дикого типа гена WAP7.1, кодирующего белок SEQ ID NO: 1 или белка, по меньшей мере, на 94% идентичного SEQ ID NO: 1, и/или один или несколько мутантных аллелей гена WAP7.1. Могут обнаруживаться различные мутантные аллели гена WAP7.1. Таким образом, не только мутантный аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 2, 10, 11, 12, 13 или 14, но и анализ может быть разработан для обнаружения любого другого мутантного аллеля гена WAP7.1, включая те, которые описаны в Таблице 1, и другие.

Как указывалось выше, предпочтительно выполняется анализ биаллельного генотипа, например, анализ KASP, анализ TaqMan, анализ BHQplus, 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), обеспечивающих специфичность к ОНП или инсерционно-делеционной мутации, которые отличают последовательность дикого типа, например, от мутантной последовательности аллеля или которые отличают последовательность двух мутантных аллелей. Таким образом, два прямых праймера имеют различную специфичность (или предпочтение) связывания, например, с аллелем дикого типа и/или, например, 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 WAP7.1 (который отличается от аллеля дикого типа вставкой, удалением или заменой одного или

нескольких нуклеотидов), или который различает между разными мутантными аллелями этого гена, т.е., например, анализ может быть разработан для любого ОНП или инсерционно-делеционной мутации, которые предназначены для дифференциации двух аллелей WAP7.1.

Отмечается, что анализы на генотипирование, такие как анализ KASP, также можно проводить для обнаружения мутантного и/или аллеля WAP7.1 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 WAP7.1 кодирует белок, содержащий одну или несколько аминокислот, вставленных, замененных или делетированных по отношению к белку дикого типа SEQ ID NO: 1, как уже описано в другом разделе настоящего документа.

Таким образом, в одном варианте осуществления предусмотрен способ обнаружения и, факультативно, селекции растения, семян или части растения арбуза, содержащего, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена WAP7.1, включающий в себя:

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, предусматривающий 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 одного или нескольких мутантных аллелей гена, отличающихся тем, что аллель дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 (или белок WAP7.1 дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,8% или 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 1, и мутантный аллель кодирует белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, удаленных или замененных по отношению к белку дикого типа SEQ ID NO: 1 (или в отношении белка WAP7.1 дикого типа, имеющего, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,8% или 99,9% идентичности с SEQ ID NO: 1, и в некоторых случаях

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

На этапе b) анализ на генотипирование позволяет различать, например, аллели дикого типа и/или один или несколько мутантных аллелей на основе реакций амплификации нуклеиновых кислот (особенно 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 анализе используется один или несколько специфичных для аллеля WAP7.1 праймеров или один или несколько зондов, специфичных для аллеля WAP7.1.

Как уже указывалось ранее, на основе геномной последовательности SEQ ID NO: 6 или других (например, вырожденных) геномных последовательностей, которые кодируют белок SEQ ID NO: 1, или геномной последовательности мутантного аллеля, который кодирует, например, белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, удаленных или замененных по сравнению с SEQ ID NO: 1, 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 имеют, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности по сравнению с целевой последовательностью. Специфичность праймера или зонда, например, к аллелю дикого типа или мутантному аллелю (или к двум или более мутантным аллелям) 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, ОНП или инсерционно-делеционная мутация) между двумя (или более) 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 BHQplus 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 дикого типа WAP7.1, кодирующего белок SEQ ID NO: 1, две копии мутантного аллеля WAP7.1, кодирующего мутантный белок из таблицы 1, или по одной копии каждого аллеля (гетерозиготные). В еще одном аспекте указанные способы можно использовать для различения растений, семян или частей растений, содержащих одну или две копии любого одного или нескольких мутантных аллелей WAP7.1, кодирующих мутантные белки из таблицы 1. В некоторых случаях 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 различает между ОНП G/A в нуклеotide 51 SEQ ID NO: 5. Таким образом, праймеры или зонды обнаруживают аллель, содержащий G или A в нуклеotide 51 SEQ ID NO: 5.

В зависимости от ОНП или инсерционно-делеционной мутации для использования в рамках анализа между аллелем дикого типа и мутантными аллелями WAP7.1 можно разработать различные аллель-специфические праймеры и зонды. См. также информацию по ОНП в Таблице 1.

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

праймер (например, 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 WAP7.1 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, например, аллеля дикого типа, либо амплификации мутантного аллеля; или которые придают специфичность различным мутантным аллелям. 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, например, аллеля дикого типа и/или (одного или двух, или нескольких) мутантных аллелей гена WAP7.1, включающий:

а) обеспечение геномной ДНК растения арбуза или ряда растений (например, селекционная популяция, F2, обратное скрещивание и т.д.),

б) 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, отличающийся тем, что аллель дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или белок дикого типа, который, по меньшей мере, на 94% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, а мутантный аллель кодирует белок, содержащий одну или несколько вставленных, дублированных, удаленных или замещенных аминокислот по отношению к белку дикого типа SEQ ID NO: 1 или белок дикого типа, который, по меньшей мере, на 94% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, и в некоторых случаях

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

Также предусмотрен способ амплификации всего или части мутантного аллеля и/или аллеля WAP7.1 дикого типа из образца геномной ДНК, полученного из растения, части растения или семени арбуза, включающий в себя приведение геномной ДНК в контакт с парой праймеров, которая амплифицирует весь или часть мутантного аллеля WAP7.1 и/или аллеля WAP5.7 дикого типа в образце, а также обнаружение продуктов амплификации.

Также предусмотрен способ гибридизации зонда с мутантным аллелем и/или аллелем WAP7.1 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 WAP7.1 и/или с аллелем WAP7.1 дикого типа в образце, а также выявление продуктов 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 аллеля (или одного, или двух, или нескольких аллелей) 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, например, мутантного аллеля и/или аллеля дикого типа в образце ДНК. Пары праймеров или зонды предпочтительно являются аллель-специфичными, и, таким образом, продукты можно различить, например, 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).

Вышеупомянутые анализы можно проводить для маркерной селекции (МС) растений, например, в рамках селекционной программы для селекции растений, содержащих определенный генотип, например, гомозиготные по аллелю дикого типа гена WAP7.1, гомозиготные или гетерозиготные по мутантному аллелю аллеля WAP7.1.

Таким образом, настоящим документом также предусмотрен способ селекции растений арбуза, включающий в себя генотипирование одного или нескольких растений по аллельной композиции в локусе WAP7.1 в геноме и, факультативно, селекция одного или нескольких растений, имеющих определенный генотип в локусе WAP7.1. В одном аспекте также может выполняться генотипирование путем секвенирования гена WAP7.1.

Как уже указывалось выше, растения или семена, которые содержат две копии мутантного аллеля WAP7.1, могут факультативно 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 предлагается растение, семя или часть растения арбуза, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена C1WAP7.1 в арбузе, причем указанный мутантный аллель либо

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

б) кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, замещенных, вставленных или удаленных по сравнению с белком дикого типа,

отличающееся тем, что указанный мутантный аллель а) или б) придает факультативную партенокарпию, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме (по сравнению с растением, содержащим аллель дикого типа в гомозиготной форме), и отличающееся тем, что аллель C1WAP7.1 арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или белок, который имеет, по меньшей мере, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

Способы разведения

Кроме того, предусмотрен способ скрещивания растения, содержащего, по меньшей мере, один мутантный аллель *WAP7.1*, как указано в настоящем документе, с

растением, в котором, например, отсутствует мутантный аллель *WAP7.1*, и селекцию потомства, содержащего, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *WAP7.1*.

Таким образом, в одном аспекте предложен способ получения растения арбуза, включающий следующие этапы:

- a) получения растения арбуза, содержащего, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *WAP7.1*, в соответствии с описанием;
- b) скрещивания указанного растения арбуза с другим растением арбуза для получения семян F1;
- c) факультативное самоопыление растения арбуза, выращенного из семян F1 один или несколько 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) селекция потомства обратного скрещивания, которое содержит мутантный аллель *WAP5.1* этапа a).

В некоторых случаях растение с этапа e) содержит две копии мутантного аллеля *WAP7.1* и является факультативным партенокарпом.

Селекцию или обнаружение присутствия мутантного аллеля *WAP7.1* на любом из этапов можно факультативно проводить с применением молекулярных методов, таких как генотипирование ОНП или инсерционно-делеционная мутация, 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 в себя 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 WAP7.1, отличающийся тем, что аллель дикого типа гена кодирует белок WAP7.1, который имеет, по меньшей мере, 94% идентичности последовательности с белком SEQ ID NO 1.

Способ может дополнительно включать один или оба этапа

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

определения, дает ли растение плоды в отсутствие опыления.

Кроме того, настоящим документом предусмотрены любые последовательности и молекулы последовательностей, а также последовательности, которые имеют, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 99,9% идентичности 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, МС) 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 WAP7.1 арбуза дикого типа

SEQ ID NO: 2: мутантный белок WAP7.1 арбуза, содержащий замену W1054STOP

SEQ ID NO: 3: кДНК, кодирующая белок WAP7.1 дикого типа

SEQ ID NO 4: кДНК, кодирующая мутантный белок WAP7.1, содержащий А вместо G в нуклеотиде 3162, т.е. содержащий кодон TGA (стоп) вместо кодона TGG (W)

SEQ ID NO 5: Маркер ОНП mWM23348403 в нуклеотиде 51 (G/A) для обнаружения мутантного аллеля *wap7.1* или аллеля *Wap7.1* дикого типа. В аллеле дикого типа кодон TGG кодирует W, W1054 SEQ ID NO: 1. В мутантном аллеле G заменен на A (GA), и полученный мутантный кодон TGA является стоп-кодоном. Таким образом, маркер ОНП содержит A в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 или в эквивалентном нуклеотиде 51 последовательности, которая, по меньшей мере, на 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 5, можно использовать для обнаружения мутантного аллеля *wap7.1*, в то время, как маркер ОНП, содержащий G в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 или в эквивалентном нуклеотиде 51 последовательности, которая, по меньшей мере, на 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 5, может использоваться для обнаружения аллеля дикого типа *wap7.1*.

SEQ ID NO 6: последовательность геномной ДНК, кодирующая белок WAP7.1 дикого типа

SEQ ID NO 7: последовательность геномной ДНК, содержащая A вместо G в нуклеотиде 7394, т.е. включающая кодон TGA (стоп) вместо кодона TGG (W) и кодирующая мутантный белок WAP7.1

SEQ ID NO 8: аминокислотная последовательность, кодируемая геном C1CG07G008850.1

SEQ ID NO 9: аминокислотная последовательность, кодируемая геном Cla97C07G135900.1

SEQ ID NO: 10: мутантный белок WAP7.1 арбуза, содержащий Q373STOP замещение

SEQ ID NO: 11: мутантный белок WAP7.1 арбуза, содержащий R346K замещение

SEQ ID NO: 12: мутантный белок WAP7.1 арбуза, содержащий S324N замещение

SEQ ID NO: 13: мутантный белок WAP7.1 арбуза, содержащий P830S замещение

SEQ ID NO: 14: мутантный белок WAP7.1 арбуза, содержащий A328T замещение

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. ЛКП был картирован в области 5,6 млн п.о./24,6 сМ на хромосоме 7. В этом интервале было зафиксировано 16 мутаций, и все они были предсказаны как межгенные, за исключением одной, которая вводила преждевременный стоп-кодон в гене, кодирующем белок «цинковый палец» в гене, обозначенном как C1CG07G008850.1.

В базе данных cucurbitgenomics.org генома Чарльстон Грей ген был обозначен, как C1CG07G008850.1 и располагался на промежутке между нуклеотидами от 23357225 до 23365257 хромосомы 7 (CG_Chr7).

В базе данных cucurbitgenomics.org генома разновидности 97103 V2 ген был обозначен, как Cla97C07G135900.1 и располагался на промежутке между нуклеотидами от 21927587 до 21935619 хромосомы 7 (Cla97Chr7).

Тем не менее, несмотря на то что обе геномные последовательности были на 100% идентичными, кодируемые белки были описаны как разные. С помощью анализа последовательности РНК было установлено, что правильным кодируемым белком является белок SEQ ID NO: 1. На фигуре 3 показаны различия между белками.

Было обнаружено, что мутантный аллель *wap7.1* является полностью уникальным для этой линии, когда его сравнивали с 93 линиями с повторным секвенированием всего генома.

Были сконструированы насыщающие этот интервал маркеры, после чего они были запущены в популяцию F₂. Маркер mWM23348403 с наибольшей ассоциацией с указанным признаком был сконструирован для гена «цинковый палец». Чтобы подтвердить данную мутацию, с помощью mWM23348403 и фланкирующих маркеров было генотипировано еще 400 дополнительных F₂. Наиболее высоким связанным маркером был mWM23348403, что дополнительно подтвердило, что мутация, для которой был разработан этот маркер, лежала в основе признака.

Ген *wap7.1* является единственным рецессивным геном, а факультативный партенокарпический фенотип сегрегирован с мутантным аллелем *wap7.1* у растений, которые являются гомозиготных в силу мутации (*wap7.1/wap7.1*).

Основываясь на информации о гене WAP7.1, был проведен скрининг (индуцированной ЭМС) мутантной популяции арбузов (также называемой популяцией TILLING), и идентифицированы растения, содержащие мутантные аллели, которые показаны в Таблице 1.

Направленный мутагенез

Целенаправленное редактирование генома с использованием сконструированных нуклеаз получило широкое распространение в различных областях. В арбузе Crispr успешно использовался для модификации генов-мишеней, см., например, Ван Ю., Ван Дж., Го С. и др. CRISPR/Cas9-опосредованный мутагенез CIBG1 уменьшал размер семян и способствовал прорастанию семян арбуза. Хортич Рез 8, 70 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00506-1>, какие методы и векторы также можно использовать для создания мутаций в гене WAP7.1.

Одноосновные замены или делеции одного или нескольких нуклеотидов можно осуществлять с помощью гомологичной рекомбинации (ГР).

Можно использовать бинарный вектор CRISPR/Cas9, например, как описано в работе Wang и др. (см. выше). Конкретные одиночные направляющие РНК (сгРНК), нацеленные на WAP7.1, могут выбираться в соответствии с оценкой с помощью CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>). Целевую последовательность клонируется в вектор, который затем используется для трансформации сорта арбуза.

Эксплантаты арбуза можно трансформировать по модифицированному методу, разработанному Йу и др. (2011 Plant Cell Rep 30: 359–371). Вкратце, поверхностно стерилизованные семена арбуза были высеяны на основную твердую среду Мурасиге и Скуга с добавлением 3% сахарозы в течение 3 дней. Затем семядоли без зародыша были разрезаны на кусочки размером 2×2 мм. Для трансформации можно использовать штамм *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, содержащий указанный вектор. Семядольные эксплантаты совместно культивируются в темноте в течение 4 дней, а затем переносятся на селективную среду индукции, содержащую 1,5 мг/л 6-ВА, 2 мг/л Basta. Регенерированные адвентивные почки вырезаются и переносятся на селективную среду для удлинения, содержащую 0,1 мг/л -ВА, 0,01 мг/л N-ацетиласпартата, 2 мг/л Basta.

Плазмидный вектор содержит кассеты, экспрессирующие CAS9 и две направляющие РНК (гРНК), а также донорный фрагмент в качестве матрицы для гомологически направленной репарации (HDR). Экспрессия гена Cas9 и гРНК стимулируется сильным промотором, таким как промотор убиквитина. Конструирование гРНК осуществляется на противоположных цепях двух сайтов-мишеней.

Донорный фрагмент содержит желаемую мутацию в середине фрагмента, соответствующего последовательности целевого гена WAP7.1 (за исключением мутации). В некоторых случаях дополнительные синонимичные мутации, которые не изменяют аминокислотные радикалы во фрагменте донора, могут помешать Cas9 снова разрезать донорный фрагмент после успешного достижения гомологически направленной репарации. Этот фрагмент фланкирован двумя целевыми последовательностями гРНК, включая смежные с протоспейсером мотивы, соответственно, так что донорная ДНК может быть высвобождена с помощью Cas9/гРНК из плазмидного вектора; см. напр. Сан и др. (2016) *Molecular Plant* 9, 628–631 DOI: 10.1016/j.molp.2016.01.001.

Для увеличения гомологически направленной репарации в эксплантат можно одновременно ввести дополнительный свободный донорный фрагмент ДНК. После трансформации регенерированные побеги, отобранные на основе, например, плазмидного вектора, кодирующего устойчивость к антибиотикам, выращиваются и анализируются на предмет наличия мутаций. Это можно выполнить с использованием праймеров для амплификации последовательности целевого гена из ДНК с помощью ПЦР. Праймеры конструируются таким образом, чтобы они не могли амплифицировать фрагмент из плазмиды. Амплифицированный продукт можно секвенировать для подтверждения наличия мутации.

С использованием стандартных способов растения можно регенерировать из трансформированного растительного материала, содержащего желаемую мутацию.

Например, в соответствии с описанием в работе Ванг и др. (см. выше), геномную ДНК можно выделить из молодых листьев трансгенных растений T0-T4, которые затем использовались для создания матриц для амплификации специфических фрагментов в целевом гене с использованием праймеров, фланкирующих два целевых сайта. ПЦР можно проводить при следующих условиях: 94 °C/5 мин; 94 °C/30 с, 56 °C/30 с и 72 °C/1 мин (35 циклов); и 72 °C/10 мин в качестве окончательного удлинения. Продукты ПЦР можно непосредственно секвенировать с использованием стандартных методов.

Трансгенные растения также можно проверить на предмет отсутствия Cas9 с помощью специфичных для Cas9 праймеров. ПЦР можно проводить при следующих условиях: 94 °C/5 мин; 94 °C/30 с, 60 °C/30 с и 72 °C/1 мин (29 циклов); и 72 °C/10 мин в качестве окончательного удлинения.

Формула изобретения

1. Растение или часть растения арбуза, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля эндогенного гена WAP7.1, 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 WAP7.1 дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или белок, содержащий, по меньшей мере, 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

2. Растение или часть растения арбуза по п. 1, причем указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий, по меньшей мере, 20 аминокислот, делетированных на С-терминальном конце белка.

3. Растение или часть растения арбуза по п. 1, причем указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий, по меньшей мере, 100 аминокислот, делетированных на С-терминальном конце белка.

4. Растение или часть растения арбуза по любому из предшествующих пунктов, причем указанный мутантный аллель содержит мутацию в кодоне, кодирующем аминокислоту SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

5. Растение или часть растения арбуза по любому из предшествующих пунктов, причем указанный мутантный аллель имеет геномную последовательность SEQ ID NO: 7.

6. Растение или часть растения арбуза по п. 1, причем указанный мутантный аллель содержит мутацию в кодоне, кодирующем аминокислоту номер R346 или S342, или P830, или A328, или Q373 SEQ ID NO: 1, или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

7. Растение или часть растения арбуза по любому из предшествующих пунктов, причем мутантный аллель образуется путем случайного мутагенеза или направленного мутагенеза, такого как способы на основе CRISPR.

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

9. Растение или часть растения арбуза по любому из пп. 1 - 7, причем растение или часть растения является триплоидным или тетраплоидным и содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля.

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

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

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

13. Растение или часть растения арбуза по любому из пп. 1 - 10, причем указанное растение или часть растения дополнительно содержат ген, придающий мужское бесплодие, или ген, придающий стеноспермокарпию, или другой ген, придающий партенокарпию.

14. Часть растения арбуза по любому из предшествующих пунктов, содержащая, по меньшей мере, один мутантный аллель по любому из пп. 1 - 6, причем часть растения представляет собой клетку, цветок, лист, стебель, черенок,

семяпочку, пыльцу, корень, подвой, отросток, плод, протопласт, зародыш, пыльник.

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

16. 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.

17. 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.

18. Способ скрининга растений арбуза, семян, частей растения или их ДНК на наличие мутантного аллеля гена WAP7.1 или селекции растения, семени или части растения арбуза, содержащих мутантный аллель гена, известного как WAP7.1, включающий следующие этапы:

- a) анализ наличия в геномной ДНК аллеля WAP7.1 дикого типа, который кодирует белок SEQ ID NO: 1, или белка, который, по меньшей мере, на 94% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1, и/или мутантного аллеля WAP7.1, который кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, замененных, вставленных или делетированных, по сравнению с белком WAP7.1 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.

19. Способ по п. 18, причем этап а) включает способ, выбранный из:
- i) амплификации, по меньшей мере, части аллеля WAP7.1 с использованием одного или более олигонуклеотидных праймеров, которые гибридизуются с ДНК аллеля WAP7.1,
 - ii) гибридизации одного или более олигонуклеотидных зондов, по меньшей мере, с частью ДНК аллеля WAP7.1,
 - iii) секвенирования ДНК, мРНК или кДНК аллеля WAP7.1.

20. Способ скрининга и/или селекции растений, семян или растительного материала, или частей растения, или ДНК, или РНК, или полученного из них белка на наличие мутантного аллеля *wap7.1*, включающий один или более следующих этапов:

- a) определение наличия сниженной или отсутствующей экспрессии эндогенного гена WAP7.1;
- b) определение сниженного количества или отсутствующего белка WAP7.1 дикого типа;
- c) определение наличия мутантной мРНК, кДНК или геномной ДНК, кодирующей мутантный белок WAP7.1;
- d) определение наличия мутантного белка WAP7.1;

причем эндогенный ген WAP7.1 представляет собой ген, который кодирует белок WAP7.1 дикого типа SEQ ID NO: 1.

Фигура 1



Фигура 2

WAP7.1WT	1	MDKPLDPPPLDFYKPRLOPDDPTPPPPDASVLGNSHHPPHLMDSHIDDSKL	50
wap7.1	1	MDKPLDPPPLDFYKPRLOPDDPTPPPPDASVLGNSHHPPHLMDSHIDDSKL	50
WAP7.1WT	51	VGVPVAGPLL PADSSPAAKLNAKFKDKVLVVDKTLGIRRRGRPPRGQVKP	100
wap7.1	51	VGVPVAGPLL PADSSPAAKLNAKFKDKVLVVDKTLGIRRRGRPPRGQVKP	100
		Zn-связывающий домен	
WAP7.1WT	101	PPLPPRQKKDEEDVCFICFDGGSVLVLCDRRGCPKAYHPSCI KRDESFERS	150
wap7.1	101	PPLPPRQKKDEEDVCFICFDGGSVLVLCDRRGCPKAYHPSCI KRDESFERS	150
WAP7.1WT	151	<u>KAKWNCGWHICTNCQKASYMICYTCPFSLCKGCIKGADYQCVRGTKGFCG</u>	200
wap7.1	151	<u>KAKWNCGWHICTNCQKASYMICYTCPFSLCKGCIKGADYQCVRGTKGFCG</u>	200
WAP7.1WT	201	TCMKIIMLFEKSAPDGESVQVDFDDKSSWEYLFKVYWIYLKEKLSLTVDE	250
wap7.1	201	TCMKIIMLFEKSAPDGESVQVDFDDKSSWEYLFKVYWIYLKEKLSLTVDE	250
WAP7.1WT	251	LVRAKNSWKGSIIIMDHKVASSEILDGSI DKSQGAHNSFRNPKSQKRPNR	300
wap7.1	251	LVRAKNSWKGSIIIMDHKVASSEILDGSI DKSQGAHNSFRNPKSQKRPNR	300
WAP7.1WT	301	QQSSLNKFGSLVDRPSSNEQFSVSTKWATTELMDFVAHVRNGDTTRLSPL	350
wap7.1	301	QQSSLNKFGSLVDRPSSNEQFSVSTKWATTELMDFVAHVRNGDTTRLSPL	350
		Пептид Связывающий Домен	
WAP7.1WT	351	<u>DVQALLLEYVKNNLRDPQQSQINCDLRLTNLFGKSRI GHFEMLNLLQS</u>	400
wap7.1	351	<u>DVQALLLEYVKNNLRDPQQSQINCDLRLTNLFGKSRI GHFEMLNLLQS</u>	400
WAP7.1WT	401	HVHIKGTADNATSSGAGVINPVESKEKYDCEVDDCERKRKTRKKADE	450
wap7.1	401	HVHIKGTADNATSSGAGVINPVESKEKYDCEVDDCERKRKTRKKADE	450
		Плюс3 Домен	
WAP7.1WT	451	<u>SRQQLHAI VDEYAAIDIQNINLIYLRRLD L I V S L I D D E K F N D M V I G S I V R I</u>	500
wap7.1	451	<u>SRQQLHAI VDEYAAIDIQNINLIYLRRLD L I V S L I D D E K F N D M V I G S I V R I</u>	500
WAP7.1WT	501	<u>QIPNNDEKHDFHRLVQVVGISKISTPYTVGEKTIDVMLDILNLDKRESVS</u>	550
wap7.1	501	<u>QIPNNDEKHDFHRLVQVVGISKISTPYTVGEKTIDVMLDILNLDKRESVS</u>	550
WAP7.1WT	551	<u>VQGISNQEFTEEECRRLRSIKCGLVKRFRVSEILDKGRELQALKIKDLL</u>	600
wap7.1	551	<u>VQGISNQEFTEEECRRLRSIKCGLVKRFRVSEILDKGRELQALKIKDLL</u>	600
WAP7.1WT	601	QKEISQLTHLHDQASEKGNVDELRIFAERLHRLKSP EECQRRLL E I L E V R	650
wap7.1	601	QKEISQLTHLHDQASEKGNVDELRIFAERLHRLKSP EECQRRLL E I L E V R	650
WAP7.1WT	651	SDPTMDPSYSEEDKDESNNKRQGS L K R S R N Y D F D E K E V E L T S P R R G T N S	700

wap7.1	651	 SDPTMDPSYESEEDKDESNNKRQGS�KRSRNYDFDEKEVELTSPRRGTNS	700
WAP7.1WT	701	NVSGSDVQONSTSTSEQSRNISLLAHENKEGDCLASDRTGETSWAGRGLV	750
wap7.1	701	 NVSGSDVQONSTSTSEQSRNISLLAHENKEGDCLASDRTGETSWAGRGLV	750
WAP7.1WT	751	PNNWNVPSQAKTATPLSSDGNVQVVLPEASIPPLSIGLGTSSNDAEVERI	800
wap7.1	751	 PNNWNVPSQAKTATPLSSDGNVQVVLPEASIPPLSIGLGTSSNDAEVERI	800
WAP7.1WT	801	Пролин Связывающий Мотив WQYQDPTGKVQGPFSMTQLRNWNNSGHFTPDLRVWRITESQNDAVLLTNA	850
wap7.1	801	 WQYQDPTGKVQGPFSMTQLRNWNNSGHFTPDLRVWRITESQNDAVLLTNA	850
WAP7.1WT	851	LNGCYTKASSIWHNSHILSLGRGNLSLGGSDNHHNGQSNGGTDSGTNLI	900
wap7.1	851	 LNGCYTKASSIWHNSHILSLGRGNLSLGGSDNHHNGQSNGGTDSGTNLI	900
WAP7.1WT	901	RFGVDPIRNSNSEQKDHIIVCDAENEPMMSTGSSSPSKDLCAPADTVNSI	950
wap7.1	901	 RFGVDPIRNSNSEQKDHIIVCDAENEPMMSTGSSSPSKDLCAPADTVNSI	950
WAP7.1WT	951	QSPARNLEVAHESLKNNSWSYPSLMNLLSSATLSLQPPVTEVHQAKENH	1000
wap7.1	951	 QSPARNLEVAHESLKNNSWSYPSLMNLLSSATLSLQPPVTEVHQAKENH	1000
WAP7.1WT	1001	SPNNEDQNSQTITLGGIHSQTGRKKRSSSEDCSSQSSGQNWIAAPPATDTS	1050
wap7.1	1001	 SPNNEDQNSQTITLGGIHSQTGRKKRSSSEDCSSQSSGQNWIAAPPATDTS	1050
WAP7.1WT	1051	SREWNSNCSGLSLMDSFKPSEKIGEILPDI PHSTLKPVTADAEIKQSASS	1100
wap7.1	1051	 SRE-----	1053
WAP7.1WT	1101	SVLVQNSGLSWSSASSLPGGRQLPSHVAAGAWGGGYLAAPGRAIEDLNSS	1150
wap7.1	1054	-----	1053
WAP7.1WT	1151	FITASGMKSSDIIDDHETTGINWIDDEPNDFNSLVDESVDLLAEVEA	1200
wap7.1	1054	-----	1053
WAP7.1WT	1201	MECLSGLASTASMMNCNEGLTRDSRSDCFFSVDGFNPAAEMGKVDALSST	1250
wap7.1	1054	-----	1053
WAP7.1WT	1251	ANLQFPFNKVKDEQP	1266
wap7.1	1054	-----	1053

Фигура 3

WAP7.1 MDKPLDPPLDFYKPRLOPDDPTPPPPDASVLGNSHHPHLMDSHIDDSKLVGVPVAGPLL
97103 MDKPLDPPLDFYKPRLOPDDPTPPPPDASVLGNSHHPHLMDSHIDDSKLVGVPVAGPLL
CG MDKPLDPPLDFYKPRLOPDDPTPPPPDASVLGNSHHPHLMDSHIDDSKLVGVPVAGPLL

WAP7.1 PADSSPAAKLNAKFKDKVLVVDKTLGIRRRGRPPRGQVKPPLPPRQKKDEEDVCFICFD
97103 PADSSPAAKLNAKFKDKVLVVDKTLGIRRRGRPPRGQVKPPLPPRQKKDEEDVCFICFD
CG PADSSPAAKLNAKFKDKVLVVDKTLGIRRRGRPPRGQVKPPLPPRQKKDEEDVCFICFD

Zn-связывающий домен

WAP7.1 GGSVLVCDRRGCPKAYHPSCIKRDESFRRSKAKWNCGWHICTNCQKASYMICYTCPFSLC
97103 GGSVLVCDRRGCPKAYHPSCIKRDESFRRSKAKWNCGWHICTNCQKASYMICYTCPFSLC
CG GGSVLVCDRRGCPKAYHPSCIKRDESFRRSKAKWNCGWHICTNCQKASYMICYTCPFSLC

WAP7.1 KGCIKGADYQCVRGTKGFCGTCMKIIMLFEKSAPDGESVQVDFDDKSSWEYLFKVYWIYL
97103 KGCIKGADYQCVRGTKGFCGTCMKIIMLFEKSAPDGESVQVDFDDKSSWEYLFKVYWIYL
CG KGCIKGADYQCVRGTKGFCGTCMKIIMLFEKSAPDGESVQVDFDDKSSWEYLFKVYWIYL

WAP7.1 KEKLSLTVDELVRAKNSWKGSIMDHKVASSEILDGSDKSGAHNSFRNPKSQKRPNR
97103 KEKLSLTVDELVRAKNSWKGSIMDHKVASSEILDGSDKSGAHNSFRNPKSQKRPNR
CG KEKLSLTVDELVRAKNSWKGSIMDHKVASSEILDGSDKSGAHNSFRNPKSQKRPNR

WAP7.1 QQSSLNKFGLVDRPSSNEQFSVSTKWATTELMDFVAHVRNGDTRLSPLDVQALLLEYV
97103 QQSSLNKFGLVDRPSSNEQFSVSTKWATTELMDFVAHVRNGDTRLSPLDVQALLLEYV
CG QQSSLNKFGLVDRPSSNEQFSVSTKWATTELMDFVAHVRNGDTRLSPLDVQALLLEYV

Пептид Связывающий Домен

WAP7.1 KKNLNRDPQQQSQINCDLRLTNLFGKSRIGHFEMLNLLQSHVHIKGTADNATSSGAGVV
97103 KKNLNRDPQQQSQINCDLRLTNLFGKSRIGHFEMLNLLQSHVHIKGTADNATSSGAGVV
CG KKNLNRDPQQQSQINCDLRLTNLFGKSRIGHFEMLNLLQSHVHIKGTADNATSSGAGVV

Плюс3 Домен

WAP7.1 INPVESKEKYDCEVVDDCERKRKTRKKADESQQQLHAIVDEYAAIDIQINLIYLRRDLI
97103 INPVESKEKYDCEVVDDCERKRKTRKKADESQQQLHAIVDEYAAIDIQINLIYLRRDLI
CG INPVESKEKYDCEVVDDCERKRKTRKKADESQQQLHAIVDEYAAIDIQINLIYLRRDLI

WAP7.1 VSLIDDEKFNDMVGISIVRIQIPNNDKXDFHRLVQVVGISKISTPYTVGEKTI DVMLDI
97103 VSLIDDEKFNDMVGISIVRIQIPNNDKXDFHRLVQVVGISKISTPYTVGEKTI DVMLDI
CG VSLIDDEKFNDMVGISIVRIQIPNNDKXDFHRLVQVVGISKISTPYTVGEKTI DVMLDI

WAP7.1 LNLDKRESVSVQGISNQEFTEEECRRLRRSIKCGLVKRFRVSEILDKGRELQALKIKDLL
97103 LNLDKRESVSVQGISNQEFTEEECRRLRRSIKCGLVKRFRVSEILDKGRELQALKIKDLL
CG LNLDKRESVSVQGISNQEFTEEECRRLRRSIKCGLVKRFRVSEILDKGRELQALKIKDLL

WAP7.1 QKEISQLTHLHDQASEKGNVDEL-----RYFAERLHR
97103 QKEISQLTHLHDQASEKGNVDEYPFMRCHFELTLLCYRACRQWTRSTGAEKYFAERLHR
CG QKEISQLTHLHDQASEKGN-----RLHR

WAP7.1 LKSPEECQRRLEILEVRS DPTMDPSYESEEDKDES NKKRQGS LKRSRNYDFDEKEVELT
97103 LKSPEECQRRLEILEVRS DPTMDPSYESEEDKDES NKKRQGS LKRSRNYDFDEKEVELT
CG LKSPEECQRRLEILEVRS DPTMDPSYESEEDKDES NKKRQGS LKRSRNYDFDEKEVELT

WAP7.1 SPRRG TNSNVSGSDVQONSTSTSEQSRNISLLAHENKEGDCLASDRTGETSWAGRGLVFN
97103 SPRRG TNSNVSGSDVQONSTSTSEQSRNISLLAHENKEGDCLASDRTGETSWAGRGLVFN
CG SPRRG TNSNVSGSDVQONSTSTSEQSRNISLLAHENKEGDCLASDRTGETSWAGRGLVFN

WAP7.1 NWNVPSQAKTATPLSSDGNVQVVLPEASIPPLSIGLGTSSNDAEVERIWQYQDPTGKVQG
97103 NWNVPSQAKTATPLSSDGNVQVVLPEASIPPLSIGLGTSSNDAEVERIWQYQDPTGKVQG
CG NWNVPSQAKTATPLSSDGNVQVVLPEASIPPLSIGLGTSSNDAEVERIWQYQDPTGKVQG

Пролин Связывающий Мотив

WAP7.1 PFSMTQLRNWNNSGHFTPDLRVWRITESQNDVLLTNALNGCYTKASSIWHNSHILSLGR
97103 PFSMTQLRNWNNSGHFTPDLRVWRITESQNDVLLTNALNGCYTKASSIWHNSHILSLGR
CG PFSMTQLRNWNNSGHFTPDLRVWRITESQNDVLLTNALNGCYTKASSIWHNSHILSLGR

WAP7.1 GNGLSLGGSDNHHNGQSNGGTDSGTNLI RFGVDPIRNSNSEQKDHI AVCAENEPMMSTG
97103 GNGLSLGGSDNHHNGQSNGGTDSGTNLI RFGVDPIRNSNSEQKDHI AVCAENEPMMSTG
CG GNGLSLGGSDNHHNGQSNGGTDSGTNLI RFGVDPIRNSNSEQKDHI AVCAENEPMMSTG

WAP7.1 SSSPSKDLCAPADTVNSIQSPARNLEVAHESLKNNSWSYPSLMNLLSSATLSLQPPVTE
97103 SSSPSKDLCAPADTVNSIQSPARNLEVAHESLKNNSWSYPSLMNLLSSATLSLQPPVTE
CG SSSPSKDLCAPADTVNSIQSPARNLEVAHESLKNNSWSYPSLMNLLSSATLSLQPPVTE

WAP7.1 VHQAKENHSPNNEDQNSQTITLGGIHSQTGRKKRSSSEDCSSQSSGQNW IAPPATDTSSR
97103 VHQAKENHSPNNEDQNSQTITLGGIHSQTGRKKRSSSEDCSSQSSGQNW IAPPATDTSSR
CG VHQAKENHSPNNEDQNSQTITLGGIHSQTGRKKRSSSEDCSSQSSGQNW IAPPATDTSSR

WAP7.1 EWN SNC SGLSLMDSFKPSEKIGEILPDI PHSTLKPVTADAEIKQSASSSVLVQNSGLSWS
97103 EWN SNC SGLSLMDSFKPSEKIGEILPDI PHSTLKPVTADAEIKQSASSSVLVQNSGLSWS
CG EWN SNC SGLSLMDSFKPSEKIGEILPDI PHSTLKPVTADAEIKQSASSSVLVQNSGLSWS

WAP7.1 SASSLPGGRQLPSHVAAGAWGGGYLAAPGRAIEDLNSSFITASGMKSSDI IDDHETT GAT
97103 SASSLPGGRQLPSHVAAGAWGGGYLAAPGRAIEDLNSSFITASGMKSSDI IDDHETT GAT
CG SASSLPGGRQLPSHVAAGAWGGGYLAAPGRAIEDLNSSFITASGMKSSDI IDDHETT GAT

WAP7.1 INWIDDEPNDFNSLVDESVDLLAEVEAMECLSGLASTASMMNCNEGLTRDRSRSDCFFSV
97103 INWIDDEPNDFNSLVDESVDLLAEVEAMECLSGLASTASMMNCNEGLTRDRSRSDCFFSV
CG INWIDDEPNDFNSLVDESVDLLAEVEAMECLSGLASTASMMNCNEGLTRDRSRSDCFFSV

WAP7.1 DGFNPAAEMGKVDALSSTANLQFPFNIKVKDEQP
97103 DGFNPAAEMGKVDALSSTANLQFPFNIKVKDEQP
CG DGFNPAAEMGKVDALSSTANLQFPFNIKVKDEQP
