

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392625 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.30

(51) Int. Cl. A01H 6/34 (2018.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
C12N 15/01 (2006.01)
A01H 3/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.03.16

(54) ГЕН АРБУЗА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЙ БОЛЬШОЕ КОЛИЧЕСТВО МУЖСКИХ ЦВЕТКОВ

(31) 63/166,040; 21171772.3
(32) 2021.03.25; 2021.05.03
(33) US; EP
(86) PCT/EP2022/056848
(87) WO 2022/200149 2022.09.29
(71) Заявитель:
НУНХЕМС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Пульиси Даниэль, Сирицотти
Альберто (IT), Ху Кортни, Мазахери
Мона (US), Пальярани Джулия (IT)
(74) Представитель:
Беляева Е.Н. (BY)

(57) Настоящее изобретение направлено на ген, мутация которого приводит к появлению у арбуза множества мужских цветков и к отсутствию женских цветков. Растения, содержащие мутантные аллели этого гена, полезны в качестве опылителей для получения триплоидных бессемянных плодов арбуза.

ДТ	1	MEGQTSWIRHCYNMDSRDLLEDLDSYLDFTNEGKREAVAVSVESILPDDLL	50
Мутантный	1	MEGQTSWIRHCYNMDSRDLLEDLDSYLDFTNEGKREAVAVSVESILPDDLL	50
ДТ	51	ERILSYLPIASIFRAGSVCKRWHDIVSSRRFLMNVSHILSKQWYFMPTS	100
Мутантный	51	ERILSYLPIASIFRAGSVCKRWHDIVSSRRFLMNVSHILSKQWYFMPTS	100
ДТ	101	SDEPIGYAYDFVLRKWTAINLPCIDKSNCFIASSCGLVCFMNDRSSELH	150
Мутантный	101	SDEPIGYAYDFVLRKWTAINLPCIDKSNCFIASSCGLVCFMNDRSSELH	150
ДТ	151	VCNPIITKSMKLEPTGSKFSDYSALAI SVNRVSHNYTISVVKSKQVPGN	200
Мутантный	151	VCNPIITKSMKLEPTGSKFSDYSALAI SVNRVSHNYTISVVKSKQVPGN	200
ДТ	201	FFQWDISIHVDEBTMFWVTSLEVLSGWRGGDESIVICDGLVLLIYSTG	250
Мутантный	201	FFQ-----	203
ДТ	251	GGAPDNRHGLVTYINSHSHGLLIRSPFIPAPCSLTCGRMLNKKQKLVNV	300
Мутантный	204	-----	203
ДТ	301	GGIGKQDRPDIHKIGIWIICGKREWEIARMFKFQGFGEFDDVFASCG	350
Мутантный	204	-----	203
ДТ	351	TDDLVIYQSYGAPALLTFDMNLRQWRWSQKCFVTRFPLQLTGFCEFER	400
Мутантный	204	-----	203
ДТ	401	LEINP 405	
Мутантный	204	----- 203	

A1

202392625

202392625

A1

Ген арбуза, обеспечивающий большое количество мужских цветков

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение ориентировано на растения арбуза, содержащие мутацию в гене F-box, в результате чего растение дает значительное количество мужских цветков и не дает женских цветков (либо незначительное количество женских цветков, например, на поздней стадии периода роста), когда мутантный аллель ген находится в гомозиготной форме. Ввиду того, что растения не дают женских цветков (или лишь незначительное количество женских цветков на поздней стадии), в случае с растением также может отсутствовать (или наблюдаться в весьма незначительной степени) завязывание плодов. Таким образом, оно идеально подходит в качестве растения-опылителя, позволяющего получать большое количество мужских цветков и пыльцы для опыления других растений арбуза.

Соответственно, изобретение ориентировано на растения, семена и части растений арбуза, содержащие, по меньшей мере, один, предпочтительно два мутантных аллеля рецессивного гена, их использование в качестве растений-опылителей при выращивании арбузов и фруктов, а также способы создания и/или селекции (или идентификации) растений арбуза, содержащих, по меньшей мере, один мутантный аллель гена. В одном аспекте селекцию можно без труда выполнить фенотипически, поскольку форма листа модифицируется у гомозиготного мутантного растения, по меньшей мере, в двух фоновых генотипах, но возможно также и в других фоновых генотипах. Также наблюдается срастание лепестков мужских цветков, хотя и не во всех случаях и не на всех фоновых генотипах.

По тексту настоящей заявки ген F-box именуется как *CIHWS* (для *Citrullus lanatus* HAWAIIAN SKIRT), так как при проведении BLAST-анализа по базе данных UniProt/SwissProt NCBI наиболее похожим белком является At3g61590 (арабидопсис F-box/белок кельча-повторов). Парное выравнивание At3g61590 при помощи CIHWS демонстрирует идентичность последовательностей только на 65,5% (Фигура 2) и фенотип, обусловленный мутантами At3g61590 и мутантный арбуз CIHWS значительно различаются, но при этом обладают небольшим сходством, что указывает на то, что у разных видов гены не могут быть функционально одинаковы.

Белки F-box составляют одно из крупнейших суперсемейств белков у растений, для некоторых видов насчитывающее несколько сотен генов F-box. У арабидопсиса идентифицировано не менее 694 генов F-box. Обзор генов F-box растений предоставлен в работе Xu et al., PNAS 2009 (том 106, № 3, стр. 835–840). Гены F-box растений играют роль в убиквитинировании и деградации белков, и было установлено, что генетически они контролируют многие важные процессы, такие как эмбриогенез, гормональные реакции, развитие проростков, цветочный органогенез, старение и устойчивость к патогенам.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Культивируемые растения арбуза, как правило, однодомные, с отдельными мужскими и женскими цветками. Мужские цветки содержат тычинки и производят пыльцу (часто именуется тычиночными цветками). Женские цветки содержат завязи и пестики (часто именуется пестичными цветками). Соотношение мужских и женских цветков варьируется, но для большинства культурных сортов оно составляет от 3:1 или от 4:1 до 7:1, т.е. от примерно 75% мужских цветков до примерно 25% женских цветков (соотношение 3:1) или примерно от 80% мужских цветков до примерно 20% женских цветков (соотношение 4:1), от примерно 87,5% мужских цветков до примерно 12,5% женских цветков (соотношение 7:1).

Настоящее изобретение в одном аспекте относится к рецессивному гену, который при мутации и представлении в гомозиготной форме приводит к соотношению примерно 100% мужских цветков к 0% женских цветков или 99,5%:0,5%, 99%:1%, 98%:2%, 97%:3% мужских цветков к женским, при необходимости, 96%:4%, или 95%:5% мужских цветков к женским или примерно от 92%: до 8%, или примерно от 91%: до 9%, или примерно от 90%: до 10%. Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к рецессивному гену, который при мутации и представлении в гомозиготной форме приводит к «большому соотношению мужских и женских цветков», что относится к статистически значимому более высокому соотношению мужских и женских цветков, развивающихся в течение более определенного периода времени (например, в течение 1, 2, 3 или более недель) в линии растений, гомозиготной по мутантному аллелю, по сравнению с контрольной линией, гомозиготной по аллелю дикого типа.

В одном аспекте процент мужских цветков, которые дает растение, гомозиготное по мутантному аллелю, таким образом, значительно выше, чем у растения, гомозиготного по аллелю дикого типа, например, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% цветков, которые развиваются на растении в течение определенного периода времени (например, в течение 4, 5 и/или 6 недель после пересадки в поле) или в течение всего цикла роста растения, являются мужскими цветками. Лучший способ сравнить процент мужских цветков или соотношение мужских и женских цветков – это вырастить растение, гомозиготное по мутантному аллелю, в тех же условиях и в то же время рядом с растением, гомозиготным по аллелю дикого типа и подсчитать количество цветков, которые развиваются в течение определенного периода, например, в течение одной или нескольких недель. Предпочтительно выращивают, по меньшей мере, несколько растений каждого генотипа, что позволяет сравнить среднее количество мужских и женских цветков, развивающихся у каждого генотипа в течение соответствующего периода времени.

Таким образом, в одном аспекте «более высокий или больший процент мужских цветков» относится к статистически значимому более высокому проценту мужских цветков, развивающихся в течение определенного периода времени (например, 1, 2, 3 или более недель) в линии растений, гомозиготной по мутантному аллелю, по сравнению с контрольной линией, гомозиготной по аллелю дикого типа. Например, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или даже 100% развивающихся цветков являются мужскими цветками у растения, гомозиготного по мутантному аллелю *Clhws*, а в контрольном растении (гомозиготном по аллелю дикого типа/немутантному аллелю *Clhws*) процент мужских цветков значительно ниже. Например, в примерах растение с мутантным аллелем *Clhws* растение имело (на двух разных фонах) на 17% и 24% больше мужских цветков, чем контрольное растение.

Растения арбуза, выращиваемые для получения плодов, являются либо диплоидными (2n), дающими семенные плоды после опыления женских цветков пыльцой мужских цветков, либо триплоидными (3n), дающими бессемянные плоды после опыления женских цветков пыльцой другого растения арбуза (называемого растением-опылителем), так как цветки триплоидных растений не производят плодородную пыльцу.

Таким образом, поскольку триплоидные растения не производят плодородную пыльцу, на одном и том же поле высаживают так называемые растения-опылители или опылители, поскольку для индуцирования образования плодов на триплоидном растении необходимо опыление женских цветков. Растения-опылители являются диплоидными (2n). Обычно, по данной схеме опылители и триплоидные растения высаживают в соотношении приблизительно 1 к 3, что позволяет получить достаточное количество пыльцы для опыления всех женских цветков гибридных растений F1. Обязательным также является то, чтобы растения-опылители производили большое количество пыльцы в то время, когда развиваются женские цветки триплоидных растений. McGregor and Waters (2014, Hort Science 49(6):714-721) проанализировали синхронизацию производства тычиночных цветков 20 опылителей и пестичных цветков 29 триплоидных сортов в течение первых 6 недель после пересадки в поле и пришли к выводу, что некоторые опылители и триплоиды лучше синхронизируются по характеристикам цветения, чем другие.

Коммерческие опылители можно разделить на собираемые и не собираемые (см. также *выше* работу McGregor and Waters 2014). Опылители пригодные для заготовки – это диплоидные опылители, которые при опылении женских цветков дают пригодные к реализации семенные плоды. Опылители непригодные для заготовки – это диплоидные опылители, которые при опылении женских цветков дают нежелательные плоды с сельскохозяйственной точки зрения, такие как плоды с белой мякотью, плоды с ломкой кожурой и т.д. Таким образом, производитель может выбрать выращивание триплоидных плодов без семян и диплоидных плодов с семенами в рамках одного поля или выращивание исключительно триплоидных бессемянных плодов и без учета диплоидных семенных плодов опылителя. Очевидно, что опылители занимают много места в поле, которое в противном случае могло бы быть занято триплоидными растениями, и по этой причине было разработано несколько опылителей, представляющих собой компактные растения.

Все коммерческие опылители дают плоды (как пригодные, так и непригодные для заготовки), поскольку все они дают женские цветки, которые опыляются. Одно из преимуществ описанного в настоящей заявке гена *SlHWS*, заключается в том, что растения арбуза, которые содержат мутантный аллель гена в гомозиготной форме, не дают женских цветков (или производят незначительное количество женских

цветков, которые обычно не оплодотворяются и не дают плодов), но при этом дают много мужских цветков и большое количество пыльцы в течение вегетационного периода. Кроме того, ввиду отсутствия или очень небольшого количества женских цветков, растение продолжает производить мужские цветки в течение более длительного периода времени. Соответственно, отсутствует необходимость собирать урожай или выбрасывать плоды, развивающиеся на растениях-опылителях. Кроме того, в поле требуется меньше растений-опылителей (уменьшение как минимум на 5%, 10%, 15%, 20% или даже 25% растений-опылителей), для получения достаточного количества пыльцы для опыления триплоидных растений, в результате чего количество триплоидных растений, которые можно выращивать на площади, становится больше, а с поля можно собрать больше триплоидных плодов.

Авторы настоящего изобретения установили, что мутация одного рецессивного гена в культивируемом арбузе, именуемого по тексту настоящей заявки геном *SlHWS*, приводит к тому, что у растений арбуза развиваются только мужские цветки (возможно, незначительное количество женских цветков, например, на более поздней стадии выращивания, которые обычно не оплодотворяются). Многие мужские цветки полностью способны к плодоношению и вырабатывают большое количество пыльцы. Ген был обнаружен после обнаружения мутантного растения с аномальной формой листьев в мутантной популяции арбуза (Tilling-популяция). На Фигуре 3 показана форма листьев мутантного растения слева и листа дикого типа/немутантного растения справа.

Данный фенотип формы листьев был картирован в картирующей популяции F2 и привел к идентификации гена *SlHWS* на хромосоме 5. У мутантного растения в кодирующей области присутствовал преждевременный STOP-кодон (также именуемый по тексту настоящей заявки мутантом Trp204STOP или W204*), что привело к образованию усеченного белка, см. Фиг. 1, где показано выравнивание мутантного белка *Slhws* (обозначенного «Мутант») и белка дикого типа *SlHWS* (обозначенного «ДТ»).

Помимо аномальной (или «модифицированной» или «более широколистной») формы листьев, у мутантного растения также не развились женские цветки, а только мужские. У мужских цветков наблюдались сросшиеся лепестки (см. Фиг. 4, слева), что позволяет насекомым проникать в цветы и собирать пыльцу. При необходимости, развивалось незначительное количество женских

цветков, например, в более поздний период вегетации в случае с женскими цветками, как правило, отсутствовало опыление и не завязывались плоды. Мужские цветки также продолжали развиваться в течение более длительного периода времени.

Когда мутантный аллель *Clhws* был объединен с другим рецессивным геном – данный процесс называется «ветвлением» – процент и количество мужских цветков еще больше возросли, см. Пример 2. Таким образом, растения, содержащие как мутантный аллель *Clhws* в гомозиготной форме (как описано в настоящей заявке), так и мутантный аллель множественного разветвления в гомозиготной форме, являются, соответственно, одним из вариантов осуществления изобретения. Мутантные аллели множественного разветвления описаны в заявках US63/217071 и EP21194565.4, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, одним мутантным аллелем множественного разветвления является аллель, обнаруженный у сорта Sidekick, который содержит аллель, кодирующий мутантный белок множественного разветвления последовательности SEQ ID NO: 9. Белок множественного разветвления последовательности SEQ ID NO: 9 содержит дублирование 8 аминокислот, по сравнению с белком дикого типа последовательности SEQ ID NO: 11. Мутантный аллель множественного разветвления сорта Sidekick также описан в заявке US7314979B2, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Этот конкретный аллель также присутствует в других семенах арбуза, депонированных компанией Nunhems B.V., как описано, например, в заявке US16/705760 (опубликована как US 2020/0 093086 A1), включенной в настоящий документ посредством ссылки. Например, номер доступа NCIMB 41773 (WH9307) или номер доступа NCIMB 42704 (WH9716) содержат мутантный аллель множественного разветвления в гомозиготной форме.

Как указывалось выше, по результатам анализа BLAST был идентифицирован ген, именуемый HAWAIIAN SKIRT *Arabidopsis thaliana* (сокращенно AtHWS). Мутант *Athws* охарактеризован в работе Zinnia *et al.* 2007 (Plant Physiology Том 144, pp1370-1382). Мутантное растение *hws-1* не смогло сбросить свои репродуктивные органы (чашелистики, лепестки и нити пыльников), чашелистики срослись по нижним краям, а цветочные органы остались прикрепленными у основания к развившимся стручкам (стручкам), содержащим семена, как показано на Фиг. 1F и Фиг. 5 F. Кроме того, нити пыльника часто срастались друг с другом или со стручком, а при необходимости, наблюдались

аберрантные лопатки со стручками, содержащими более двух створок. Другой фенотип, за которым наблюдали специалисты, заключался в том, что при выращивании в аналогичных условиях мутант *hws-1* имел более крупные листья и более крупные семена, по сравнению с обычным растением.

Ген AtHWS кодирует белок из 411 аминокислот, без интронов в открытой рамке считывания, но с интроном в 5'UTR. Мутант *hws-1* содержал укороченный белок (Фиг. 5B), который, как полагают специалисты, в случае экспрессии является нефункциональным. Ген AtHWS экспрессируется во многих тканях, таких как края семядолей, чашелистики, рыльце пестика, стручок, основание лепестков и чашелистиков, нити пыльников, пыльца, цветочные листья, стеблевые листья, развивающиеся семена, ткань корней и т.д. Причины того, что этот белок является белком F-бокса, были установлены по результатам исследований на дрожжевой двухгибридной системе, в которой AtHWS был связан с белками ASK (см. стр. 1377, ЛН обхац Zinnia *et al. выше*), в то время как ген AtHWS имеет лишь незначительное сходство последовательностей с другими 700 членами суперсемейства F-box у *Arabidopsis* (которые были отнесены к членам семейства F-box на основании сходства последовательностей). Функциональные характеристики обычно присваиваются вновь идентифицированным генам (например, выявленным в проектах полногеномного секвенирования) на основе сходства последовательностей, без подтверждения в естественных условиях.

Настоящий ген ClHWS кодирует белок F-box, и растение, гомозиготное по мутантному усеченному белку, идентифицированному здесь, развивает более высокий процент мужских цветков и в значительной степени подходит в качестве растения-опылителя. Подтверждающие данные, полученные в естественных условиях, устанавливают роль белка в формировании цветков. На основании идентичности низкой последовательности AtHWS и различия в фенотипе, обозначение настоящего белка как ClHWS, таким образом, не основано на каком-либо подтверждении схожих функциональных ролей *Arabidopsis* и белков F-box HWS арбуза.

Таким образом, когда мутантный аллель *Clhws* присутствует в гомозиготной форме в диплоидном растении арбуза, именуемом по тексту настоящей заявки как *Clhws/Clhws*, растения дают более высокий процент мужских цветков и, при необходимости, листьев, которые имеют другую (аномальную,

«модифицированную» или «более выраженную») форму, чем растение, гомозиготное по аллелю дикого типа (*CIHWS/CIHWS*). Мутантный белок Clhws последовательности SEQ ID NO: 2, кодируемый мутантным аллелем *Clhws*, отличающийся тем, что кодон TGG, кодирующий W или Trp (нуклеотиды с 610 по 612 последовательности SEQ ID NO: 3 или 4), заменен на кодон TAG (стоп-кодон трансляции), имеет длину всего в 203 аминокислоты и не содержит 202 аминокислот белка дикого типа. По тексту настоящей заявки данный мутант также именуется Trp204* или W204* или W204STOP. Прогнозирование трехмерной структуры показало, что у мутанта W204* отсутствует большая часть С-концевых бета-листов белка дикого типа (см. Фиг. 5, на которой представлен белок дикого типа). Таким образом, считается, что усеченный белок нефункционален *in vivo*, хотя домен F-box не изменился. Это означает, что любой мутантный аллель, который приводит к отсутствию образования белка дикого типа или образованию нефункционального белка, приведет к фенотипу, как указано в настоящей заявке, для идентифицированного мутанта Trp204*.

Таким образом, одним аспектом настоящего изобретения предусмотрено растение арбуза или его часть, которая содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *Clhws*, при этом мутантный аллель имеет пониженную или отсутствующую экспрессию (например, из-за мутаций в промоторе или другом регуляторном элементе), в результате чего наблюдается значительное снижение уровня или отсутствию образования белка дикого типа, либо содержит одну или более аминокислот, которые вставлены, делетированы или заменены по отношению к белку дикого типа SEQ ID NO: 1 (или белку дикого типа, содержащему, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1), что приводит к тому, что кодируемый белок имеет пониженную или отсутствующую функцию *in vivo* в случаях, когда мутантный аллель присутствует в гомозиготной форме у диплоидного растения арбуза.

В эталонном геноме арбуза Чарльстон Грей (адрес в сети Интернет cucurbitgenomics.org) ген дикого типа обнаружен на хромосоме 5, начиная с основания 1109369 и заканчивая основанием 1110586. В эталонном геноме сорта 97103 v2 ген дикого типа обнаружен на хромосоме 5, начиная с основания 1045193 и заканчивая основанием 1046410. Обе геномные последовательности идентичны и

также включены в настоящую заявку как SEQ ID NO: 4. Поскольку интрон отсутствует, кДНК SEQ ID NO: 3 идентична геномной ДНК SEQ ID NO: 4.

Следует отметить, что в указанных эталонных геномах присутствует ген, аннотированный в том же регионе, но начинающийся на 1187 нуклеотидов выше (и содержащий интрон) и кодирующий белок SEQ ID NO: 7. Данный ген, обозначенный C1CG05G000990, скорее всего, аннотирован неверно (см. Примеры). Геномная последовательность, кодирующая белок C1CG05G000990 SEQ ID NO: 7, предоставлена в SEQ ID NO: 8. Таким образом, эта последовательность также включает в себя SEQ ID NO: 4, которая начинается с нуклеотида 1188 SEQ ID NO: 8. В аннотации C1CG05G000990 присутствует экзон, состоящий из нуклеотидов 1 – 129 последовательности SEQ ID NO: 8, интрон, состоящий из нуклеотидов 130 – 1193 последовательности SEQ ID NO: 8 и экзон, состоящий из нуклеотидов 1194 – 2405 SEQ ID NO: 8, в результате чего белок C1CG05G000990 SEQ ID NO: 7.

Белок дикого типа и мутант *Clhws* представлены на Фиг. 1. Консервативный домен F-box выделен жирным.

Несмотря на то, что весь консервативный домен F-box присутствует в усеченном белке *Clhws*, очень маловероятно, что усеченный белок будет функционировать *in vivo*, а также предполагается, что мутация представляет собой аллель отсутствия функции. Как указывалось выше, присутствие этого мутантного аллеля *Clhws* в гомозиготной форме у диплоидного растения арбуза приводит к тому, что растение дает более высокий процент мужских цветков, чем растение дикого типа, и плоды на нем в основном не завязываются и не развиваются. Также было обнаружено изменение формы листьев (Фиг. 3, слева и Фиг. 7, слева), например, они были более широкими и рассеченными на доли, а лепестки мужских цветков часто, но не всегда, срастались в определенных фоновых генотипах (рис. 4), в то время как, например, в случае с другими фоновыми генотипами они срастались, см. Фиг. 8 (при этом мужские цветки все равно могут выглядеть иначе/иметь другой внешний вид, по сравнению с мужскими цветками дикого типа, см. Фиг. 8, слева мутант и правый мужской цветок дикого типа), что значительно упрощает селекцию растений арбуза, содержащих мутантный аллель *Clhws* путем фенотипической селекции (например, на основе формы листьев и/или внешнего вида мужских цветков), по меньшей мере, в определенных фоновых генотипах.

Аномальная, или «модифицированная», или «более широкая и рассеченная на доли» форма листьев, наблюдаемая у исходного мутанта, также наблюдалась, когда мутантный аллель *Clhws* был перенесен на другой фоновый генотип, как показано на Фигуре 7, где на левом фото показан лист растения с мутантом *Clhws*, а справа – форма листа растения дикого типа, без мутантного аллеля *Clhws*. Таким образом, более широкая форма листьев с выраженными долями, по-видимому, обусловлена присутствием мутантного аллеля *Clhws* в гомозиготной форме. Пока неясно, встречается ли более широкая форма листьев во всех фоновых генотипах, поэтому данная характеристика является необязательной для растения, содержащего мутантный аллель *Clhws*.

Кроме того, другой мутантный аллель, W229*, также обусловил наличие более широкой и рассеченной на доли формы листьев у молодых растений, см. Пример 3. Поскольку мутантный аллель W204* и мутантный аллель W229* приводят к возникновению усеченных белков, в которых отсутствуют аминокислоты 202 и 177 соответственно, белка дикого типа, и специалистами делается вывод, что у белков отсутствует функция *in vivo* и что (по меньшей мере) любая мутация, которая приводит к белку с отсутствующей функцией (белок с потерей функции) или в результате которой белок дикого типа не экспрессируется (нокаутный мутант), будет придавать фенотип, позволяющий получить высокий процент мужских цветков (или более высокое соотношение мужских и женских цветков).

Белок дикого типа *Clhws*, показанный в SEQ ID NO: 1, имеет длину 405 аминокислот и включает в себя три отдельные области: N-концевую область от аминокислоты 1 до 44, консервативный домен F-box от аминокислот 45 до 83 и C-концевую область, которая складывается в большое количество бета-складок, начиная с аминокислоты 93 и заканчивая аминокислотой 380. Прогнозируемая трехмерная структура белка показана на Фигуре 5.

Были созданы дополнительные мутанты, имеющие мутации в эндогенном аллеле *Clhws*, и их фенотип будет подтвержден путем получения растения, гомозиготного по мутантному аллелю. На данный момент идентифицированы следующие мутанты:

Таблица А

SNP	Замена кодона	Замена белка в последовательности SEQ ID NO: 1	Область белка, на которую влияет замена	Фенотип, наблюдаемый у гомозиготных растений
G/A	TGG (W), TAG (STOP)	W204Stop	Бета-структуры С-концевой области	Преимущественно мужские цветы, измененная форма листьев, сросшиеся лепестки.
G/A	GGG (G), GAG (E)	G340E	Бета-структуры С-концевой области	Испытания не проводились
G/A	GCT (A), ACT (T)	A362T	Бета-структуры С-концевой области	Испытания не проводились
G/A	TGG (W), TGA (Stop)	W229Stop	Бета-структуры С-концевой области	Измененная форма листа, пример 3 (преимущественно мужские цветы, подлежат определению)
G/A	GAG (E), AAG (K)	E324K	Бета-структуры С-концевой области	Испытания не проводились
C/T	TCT (S). TTT (F)	S67F	Домен F-box	Испытания не проводились
G/A	AGC (S), AAC (N)	S348N	Бета-структуры С-концевой области	Испытания не проводились
G/A	GGA (G), GAA (E)	G228E	Бета-структуры С-концевой области	Испытания не проводились

C/T	CTT (L), TTT (F)	L242F	Бета-структуры С- концевой области	Испытания не проводились
G/A	AGA (R), AAA (K)	R64K	Домен F-box	Обычная форма листьев (дикий тип)
Г/А	GTT (V), ATT (I)	V219I	Бета-структуры С- концевой области	Испытания не проводились
G/A	TGC (C), TAC (Y)	C69Y	Домен F-box	Испытания не проводились

Таким образом, одним из аспектов настоящего изобретения является растение, часть растения или семя арбуза, содержащие, по меньшей мере, один мутантный аллель гена *ClHWS*, отличающиеся тем, что наличие мутантного аллеля приводит к возникновению фенотипических признаков i) формируются только мужские цветки или образуется больший процент мужских цветков или образуется большее соотношение мужских и женских цветков, чем на гомозиготном растении дикого типа, а при необходимости, еще один или несколько фенотипических признаков ii) мужские цветки часто, но не всегда, имеют сросшиеся лепестки и/или мужские цветки имеют другой внешний вид и iii) растение имеет листья другой формы, чем у дикого типа, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, что обусловлено либо вырабатываемым мутантным белком со сниженной или отсутствующей функцией, по сравнению с белком дикого типа *ClHWS*, или мутантным аллелем с пониженной или отсутствующей экспрессией гена, по сравнению с аллелем дикого типа *ClHWS*, в результате чего наблюдается пониженная или отсутствующая функция белка дикого типа *ClHWS* у растения.

Таким образом, мутантный аллель *Clhws* может включать в себя одну или более аминокислот, вставленных, делетированных или замененных, по сравнению с белком дикого типа *Clhws*, либо мутантный аллель *Clhws* может содержать одну или более мутаций в регуляторной области белка, такой как промотор или энхансер, что приводит к образованию функционального белка дикого типа со сниженной или отсутствующей функцией, что, таким образом, в равной степени дает фенотипический признак (когда мутантный аллель находится в гомозиготная форма в диплоиде) i) развития только мужских цветков или развития большего процента

мужских цветков или развития большего соотношения мужских и женских цветков, чем у гомозиготного дикого типа, и, при необходимости, дополнительно один или оба следующих фенотипических признака: ii) мужские цветки часто, но не всегда, имеют сросшиеся лепестки и/или мужские цветки имеют другой внешний вид и iii) растение имеет листья разной формы.

В одном аспекте мутантный аллель содержит одну или более аминокислот, замененных, вставленных и/или делетированных в консервативном домене F-бокса (аминокислоты 45 – 83 SEQ ID NO:1 или эквивалентные аминокислоты белка, которые, по меньшей мере, на 90% идентичны последовательности SEQ ID NO: 1) и/или в области С-концевых бета-складок (аминокислоты 93 – 380 SEQ ID NO: 1 или эквивалентные аминокислоты белка, которые, по меньшей мере, на 90% идентичны последовательности SEQ ID NO: 1).

В части, касающейся мутаций в доменах F-box (или в других частях белка), в одном аспекте особенно мутации, которые приводят к заменам аминокислот, в результате чего свойства аминокислоты дикого типа и заменяемой аминокислоты различаются, являются одним аспектом изобретения, предусмотренного настоящей заявкой, поскольку такие различные свойства аминокислот приводят к уменьшению или отсутствию надлежащей складчатости и/или нормальной функции белка или домена. Сюда относится, например, замена неполярной аминокислоты полярной аминокислотой (содержащей гидрофильную боковую цепь) или *наоборот* или замена аминокислоты, имеющей заряженную боковую цепь, на незаряженную или по-другому заряженную боковую цепь, или *наоборот*. 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 Lys), серин (S или Ser), треонин (T или Thr), тирозин (Y или Tyr).

Таким образом, в одном аспекте любая одна (или несколько) неполярных аминокислот домена F-box (L, P, I, A, F, G, V, C, W) заменена полярной аминокислотой (D, E, R, S, Y, T, K, H) и/или любая одна (или несколько) полярных аминокислот домена F-box заменена неполярной аминокислотой. Полученный мутантный аллель затем можно проверить на предмет функции путем создания

растения, гомозиготного по мутантному аллелю, и путем анализа фенотипа. Если мутантный аллель приводит к тому, что растение получает измененные фенотипические характеристики: i) развиваются только мужские цветки или развивается больший процент мужских цветков или большее соотношение мужских и женских цветков, чем у гомозиготного дикого типа, и, кроме того, при необходимости, ii) часто, но не всегда, мужские цветки имеют сросшиеся лепестки и/или другой внешний вид и/или iii) растение имеет листья различной формы, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме у диплоидного растения, в этих случаях мутантный аллель представляет собой аллель, кодирующую мутантный белок ClHWS со сниженной или отсутствующей функцией *in vivo*.

В другом аспекте мутантный аллель *Clhws* кодирует усеченный белок, отличающийся тем, что, по меньшей мере, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 177, 180, 190, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, или более аминокислот C-концевой области белка дикого типа ClHWS отсутствуют или, при необходимости, заменены другими аминокислотами, в результате чего белок имеет сниженную или отсутствующую функцию *in vivo*.

В другом аспекте мутантный аллель *Clhws* кодирует усеченный белок, отличающийся тем, что, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 177, 180, 190, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 220, 225, 250, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311 или более аминокислот вставлены, заменены или делетированы из белка дикого типа ClHWS, в результате чего белок имеет сниженную или отсутствующую функцию *in vivo*.

В дополнительном аспекте мутантный аллель *Clhws* кодирует мутантный белок, отличающийся тем, что одна или несколько аминокислот домена F-box белка дикого типа Clhws делетирована или, при необходимости, заменена другими аминокислотами, или содержит вставку одной или нескольких аминокислот в домене F-box, в результате чего белок имеет сниженную или отсутствующую функцию *in vivo*. Домен F-box – это домен, начинающийся с аминокислоты 45 и заканчивающийся аминокислотой 83 SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте функциональный ген (или ген дикого типа) арбуза ClHWS представляет собой ген, кодирующий белок ClHWS, где белок ClHWS представляет

собой белок последовательности SEQ ID NO: 1 или белок, содержащий, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 (по тексту настоящей заявки именуется функциональным вариантом). Функциональные варианты белка SEQ ID NO: 1 в одном аспекте содержат домен F-box, который на 100% идентичен домену F-box SEQ ID NO: 1. Таким образом, в конкретном аспекте, обнаруженном вне консервативного домена F-box, небольшое изменение аминокислотной последовательности является незначительным.

Таким образом, другие культивируемые арбузы могут содержать аллельный функциональный вариант гена C1HWS, имеющий нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQ ID NO: 4 и может кодировать (функциональный) белок дикого типа C1HWS, который содержит, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Как уже указывалось выше, такие белки по тексту настоящей заявки также именуется функциональными вариантами белка SEQ ID NO: 1, а такие гены именуется аллельными вариантами гена SEQ ID NO: 4. Важно отметить, что они должны позволять получить измененные фенотипические характеристики (описанные в других источниках) при мутации, приводящей к нокадауну или нокауту экспрессии гена, или при мутации, кодирующей пониженную или отсутствующую функцию белка. Например, аллельный вариант, в который вводится та же мутация, которая указана в настоящем документе, например, замена одного нуклеотида (G на A) в случае с нуклеотидом 611 SEQ ID NO: 4 (приводящая к замене кодона TGG на кодон TGA, т.е. W204STOP), должен давать тот же фенотип, когда представлен в гомозиготной форме в диплоидном растении.

Одним аспектом изобретения предусмотрено растение или растительная клетка, характеризующееся тем, что растение или растительная клетка обладает сниженной активностью белка C1HWS, по сравнению с соответствующей растительной клеткой дикого типа, в результате чего белок C1HWS растительной клетки дикого типа кодируется молекулами нуклеиновой кислоты, выбранными из группы, состоящей из:

- a) молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют белок с аминокислотной последовательностью, представленной в виде SEQ ID NO: 1 (арбуз);

- b) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих белок, последовательность которого на, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в виде SEQ ID NO: 1 (арбуз);
- c) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих белок, последовательность которого на, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в виде SEQ ID NO: 1 (арбуз), отличающейся тем, что белок содержит аминокислотную последовательность домена F-box аминокислот 45 - 83 SEQ ID NO: 1;
- d) молекулы нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4 или последовательности, которая на, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 или с SEQ ID NO:4 и кодирует белок CLHWS;
- e) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 4 либо содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 8 и кодирующей белок Clhws SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7.

Снижение активности белка Clhws обусловлено мутантным аллелем *Clhws*. Снижение активности может быть вызвано нокаутом или нокаунтом экспрессии мутантного аллеля *Clhws* (например, в результате мутации в промоторе или другой регуляторной последовательности) или мутантным аллелем *Clhws*, кодирующим отсутствие или снижение функции белка Clhws (мутантный белок Clhws).

В одном аспекте мутантный аллель *Clhws* кодирует мутантный белок Clhws, для которого характерна сниженная или отсутствующая функция, по сравнению с белком дикого типа, например, мутантный белок Clhws содержит одну или более аминокислот, замененных, делетированных и/или вставленных, по сравнению с белком дикого типа.

В одном аспекте мутантный белок Clhws содержит одну или более аминокислот, замененных, делетированных и/или вставленных в область белка, выбранную из группы: а) консервативный домен F-box белка, и б) область, которая начинается с аминокислоты 84 или 93, и заканчивается аминокислотой 380, особенно начинается с аминокислоты 93 и заканчивается аминокислотой 380, особенно в

области С-концевых бета-складок, и с) отсутствие, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 201, 202, 203, 204, 205 или более аминокислот дикого типа в С-концевой области белка.

В одном аспекте, по меньшей мере, одна аминокислота заменяется другой аминокислотой или STOP-кодоном, что приводит к потере или снижению функции белка и фенотипическому изменению (как, например, указано выше), когда аллель находится в гомозиготной форме (когда аллель дикого типа отсутствует в диплоидном растении или растительной клетке).

В другом аспекте отсутствует одна или несколько аминокислот, например, в результате мутации, вызывающую преждевременное образование STOP-кодона, что приводит к потере или снижению функции белка и фенотипическим изменениям (как, например, указано выше), когда аллель находится в гомозиготной форме (когда в диплоидном растении или клетке растения отсутствует аллель дикого типа).

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, содержащий замененную аминокислоту в белке дикого типа Clhws последовательности SEQ ID NO: 1, как показано в Таблице А, или эквивалентная замененная аминокислота в белке дикого типа, которая, по меньшей мере, на 90% идентична SEQ ID NO: 1. Эквивалентная аминокислота в последовательности, которая, по меньшей мере, на 90% идентична SEQ ID NO: 1 без труда определяется путем парного выравнивания белков с использованием, например, программы Needle (с параметрами по умолчанию). Например, W204 в SEQ ID NO: 1 соответствует W245 в SEQ ID NO: 7. SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 7 имеют последовательность, которая на 90,4% идентична, и только N-концевая область отличается. На Фигуре 6 показаны выделенные жирным шрифтом мутанты из таблицы А в SEQ ID NO: 1, и эквивалентная аминокислота SEQ ID NO: 7 (также выделена жирным шрифтом). Если SEQ ID NO:7 представляет собой настоящий белок, а не является аннотационной ошибкой, настоящей заявкой предусмотрены мутанты, в результате которых белок имеет пониженную или отсутствующую функцию (как описано по тексту настоящей заявки в случае с белком SEQ ID NO:1 и другими белками дикого типа, содержащих последовательности, которые, по меньшей мере, на 90 % идентичны SEQ ID NO:1).

В одном аспекте мутантный белок усечен, в нем отсутствует, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 177, 180,

190, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, или более аминокислот С-концевой области белка дикого типа С1НWS последовательности SEQ ID NO: 1 (или белок дикого типа, который, по меньшей мере, на 90% идентичен SEQ ID NO: 1) отсутствуют или, при необходимости, заменены одной или более различными аминокислотами, в результате чего у белка наблюдается сниженная или отсутствующая функция *in vivo*.

В одном аспекте W (Trp) в положении 204 или в положении 229 SEQ ID NO: 1 или аналогичном положении белка, который, по меньшей мере, на 90% идентичен SEQ ID NO: 1, делетирован или заменен на другую аминокислоту или заменен стоп-кодоном. В одном аспекте W (Trp) в положении 245 или в положении 270 SEQ ID NO: 7 или в аналогичном положении белка, который, по меньшей мере, на 90% идентичен SEQ ID NO: 7, делетирован или заменен другой аминокислотой или заменен стоп-кодоном.

Эквивалентную аминокислоту можно легко идентифицировать при парном выравнивании обоих белков, например, белка SEQ ID NO: 1 и белка, который, по меньшей мере, на 90% идентичен SEQ ID NO: 1, с использованием инструментов парного выравнивания, таких как Emboss 'Needle' (с параметрами по умолчанию).

Сниженная или отсутствующая функция белка наблюдается в случаях, когда мутантный аллель меняет фенотип *in vivo* с фенотипа дикого типа, т.е. происходит формирование мужских и женских цветков в определенных соотношениях, нормальной формы несросшихся листьев и лепестков, когда аллель дикого типа присутствует в гомозиготной форме, на модифицированный фенотип i) развиваются только мужские цветки или больший процент мужских цветков или большее соотношение мужских и женских цветков, чем у гомозиготного дикого типа, и дополнительно, при необходимости, ii) мужские цветки часто, но не всегда, имеют сросшиеся лепестки или мужские цветки имеют другой внешний вид и/или iii) растение имеет листья различной формы, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме у диплоидного растения.

Эквивалентные аминокислоты в последовательности, которая, по меньшей мере, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1 может быть идентифицирована путем парного выравнивания (например, с использованием программы Needle) с SEQ ID NO: 1.

Эквивалентная аминокислота W204 SEQ ID NO: 1, например, можно легко идентифицировать в последовательности, которая, по меньшей мере, на 90% идентична SEQ ID NO: 1 или даже в белке *Arabiopsis AtHWS*, последовательность которого лишь на 65,5% идентична SEQ ID NO: 1, см. Фиг. 2.

В одном аспекте W204 или W229 белок арбуза SEQ ID NO: 1 (или эквивалентной аминокислоты в последовательности, которая, по меньшей мере, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или более идентична последовательности SEQ ID NO: 1) заменяется другой аминокислотой, делегируется или заменяется стоп-кодоном.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предусмотрено культивируемое растение или часть растения арбуза, содержащая, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, именуемого *SHWS*, причем указанный мутантный аллель, обуславливает изменение фенотипа: i) развиваются только мужские цветки или развивается больший процент мужских цветков или большее соотношение мужских и женских цветков, чем в случае с гомозиготным растением дикого типа, а также, при необходимости, ii) часто мужские цветки, но не всегда со сросшимися лепестками или мужские цветки, имеющие другой внешний вид, и/или iii) растение имеет листья различной формы (например, более широкие листья с выделенными долями), когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме у диплоидного растения.

В одном аспекте ген расположен на хромосоме 5 генома арбуза, в частности, ген расположен в области, начинающейся с основания 1109369 и заканчивающейся основанием 1110586 хромосомы 5 хромосомы сорта Чарльстон Грей.

В одном варианте осуществления растение или часть растения или семя, содержащее мутантный аллель гена *SHWS* является диплоидным, тетраплоидным, триплоидным или полиплоидным. Предпочтительно мутантный аллель присутствует в двух копиях в диплоидном растении, части растения или семени. При необходимости, он может присутствовать в четырех копиях в тетраплоидном растении или части растения или семени или в одной, двух или трех копиях в триплоидном растении или части растения или семени.

Часть растения, содержащая мутантный аллель гена C1HWS, может быть клеткой, цветком, листом, стеблем, черенком, пыльцой, корнем, подвоем, привоем, плодом, протопластом, зародышем, пыльником.

Также объектом изобретения является вегетативно размножающееся растение арбуза, размноженное из такой части растения, содержащей, по меньшей мере, один мутантный аллель гена C1HWS.

Аналогичным образом изобретением предусмотрено семя, из которого могут быть выращены растение по настоящему изобретению.

Кроме того, изобретением предусмотрены мужские цветки, пыльники и пыльца, формируемые растением согласно изобретению.

Предусмотрен способ получения бессемянных плодов арбуза, включающий в себя выращивание диплоидного растения (опылителя), содержащего две копии мутантного аллеля C1HWS, вблизи триплоидного растения и сбор плодов, производимых указанными триплоидными растениями. В частности, плоды формируются после опыления женских цветков триплоидного растения пыльцой диплоидного растения-опылителя (содержащего две копии мутантного аллеля гена C1HWS).

Пересадка опылителей и триплоидных растений на одном поле может выполняться как путем посева, так и за счет пересадки опылителя и триплоидных растений. Можно использовать различные способы пересадки, известные специалистам в данной области, и различные соотношения опылителей: может использоваться триплоидный гибрид. Один ряд растений-опылителей может, например, присутствовать, по меньшей мере, в каждых 2, по меньшей мере, в каждых 3, или, по меньшей мере, в каждых 4, или, по меньшей мере, в каждых 5 рядах триплоидов, при этом также можно использовать и другие способы пересадки. Поскольку опылитель сам не завязывает плоды из-за отсутствия (или очень малого количества) женских цветков, а также поскольку мужские цветки образуются в течение длительного периода после пересадки (например, более 6, 7, 8, 9, 10 недель после пересадки), для всего поля необходимо меньше растений-опылителей, а также можно выращивать больше триплоидных гибридов. Общий урожай бессемянных плодов с гектара выше. Кроме того, нет необходимости удалять, отделять или перепахивать диплоидные плоды, поскольку они не образуются.

В одном аспекте растение-опылитель содержит как мутантный аллель *Clhws* в гомозиготной форме, так и мутантный аллель множественного разветвления в гомозиготной форме. Данное сочетание приводит к очень большому количеству мужских цветков и «ветвящемуся» типу роста растения, которое более компактно и занимает меньше места в поле или теплице. Данный опылитель является предпочтительным опылителем, например, при пересадке в поле. Таким образом, в одном аспекте изобретения мутантный аллель *Clhws*, как описано в настоящей заявке, особенно мутантный аллель *Clhws*, который представляет собой нокаутный аллель или аллель с отсутствующей функцией (отсутствие экспрессии аллеля или кодирования нефункционального белка Clhws, например, усеченного белка) сочетается с мутантным аллелем множественного разветвления, например, с мутантным аллелем SEQ ID NO: 10, кодирующим мутантный белок SEQ ID NO: 9, или другим мутантным аллелем множественного разветвления, который дает фенотип с ветвлением в гомозиготной форме. Предпочтительно и мутантный аллель *Clhws*, и мутантный аллель множественного разветвления представлены в гомозиготной форме, что дает высокий процент мужских цветков и позволяет получить растение, для которого характерен тип роста с множеством ветвлений.

Предусмотрен способ получения бессемянных плодов арбуза, включающий в себя выращивание триплоидного растения и диплоидного растения-опылителя, содержащего две копии мутантного аллеля гена ClHWS, которое в одном аспекте дополнительно содержит две копии мутантного ветвящегося аллеля, что позволяет опылять цветки триплоидного растения и, при необходимости, собирать бессемянные триплоидные плоды.

Предусмотрен способ выращивания растений арбуза, включающий в себя выращивание диплоидного растения арбуза, содержащего две копии мутантного аллеля гена Clhws, при этом в одном аспекте он дополнительно содержит две копии мутантного аллеля ветвящегося гена, особенно в поле, или в теплице, или в туннеле с другими растениями арбуза, содержащими женские цветки, и, при необходимости, сбор плодов арбуза, полученных из указанных женских цветков.

Способ получения культурного растения арбуза, дающего только мужские цветки или дающего более высокий процент мужских цветков (по сравнению с растением, гомозиготным по гену CLHWS дикого типа), который включает в себя следующие этапы:

а) введение случайных или целенаправленных мутаций в одно или несколько растений, частей растений или семян арбуза; или обеспечение популяции мутантных растений или семян (например, TILLING-популяции),

б) селекция растения, которое содержит мутантный аллель гена *Clhws*, особенно мутантный аллель, который производит значительно меньшее количество белка дикого типа *Clhws* или обеспечивает его отсутствие, или обеспечивает сниженную или отсутствующую функцию мутантного белка *Clhws* (например, усеченного белка),

с) при необходимости, удаление любой трансгенной конструкции (например, системы CRISPR) из растения.

Ввиду того, что растения, гомозиготные по мутантному аллелю *Clhws* не дают женских цветков (или дают очень низкий процент женских цветков, например, в конце вегетационного периода), для получения семян растений необходимо использовать другие способы. В одном аспекте диплоидное растение арбуза, которое является гомозиготным по мутантному аллелю *Clhws*, используется в качестве родительского мужского растения для опыления диплоидного родительского растения женского пола, которое является гетерозиготным по мутантному аллелю *Clhws*. Семена собирают с такого скрещенного растения. 50% семян гомозиготны по мутантному аллелю *Clhws*. Данный способ предусмотрен настоящей заявкой. При необходимости, женское родительское растение является бесплодным мужским родительским растением. В одном аспекте недеструктивное генотипирование семян или методы селекции семян используются для отделения семян, которые являются гомозиготными по мутантному аллелю *Clhws*, из других семян или для обогащения партии семян семенами, гомозиготными по мутантному аллелю *Clhws*.

Предусмотрен способ селекции растений арбуза, включающий в себя этапы:

а) селекция растений, которые дают листья ненормальной, «модифицированной» или «более широкой и рассеченной на доли» формы, например, как показано на Фиг. 3 или Фиг. 7, слева; и/или которые дают только мужские цветки или больший процент мужских цветков, и/или мужские цветки со сросшимися лепестками, как показано на Фиг. 4 (слева), или цветками другого внешнего вида, как показано на Фиг. 8 (слева), и, при необходимости,

b) подтверждение того, что выбранные растения содержат мутантный аллель *Clhws* в гомозиготной форме в локусе 5-ой хромосомы.

Выбранные растения можно, например, складывать вместе в лотки и продавать как растения-опылители.

Этап b) может выполняться на исходном материале, например, в случае с мужскими родителем, полученным в результате скрещивания с женским родителем, который является гетерозиготным по мутантному аллелю. Если растения отбирают из популяции семян, полученных путем скрещивания мужского родителя (гомозиготного по мутантному аллелю) с женским родителем (например, гетерозиготным по мутантному аллелю), то только этап a) может выполняться самостоятельно.

Использование мутантного аллеля *Clhws* гена *ClHWS* согласно описанию в настоящем документе для получения растений арбуза, частей растений или плодов также является аспектом изобретения.

ОБЩИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Глагол «включать в себя» и варианты его спряжения не имеют ограничительного характера, что означает, что элементы, следующие за словом, включены, а элементы, не упомянутые прямо, не исключаются. Кроме того, ссылка на элемент с помощью неопределенного артикля «а» или «an» не исключает возможности присутствия более одного элемента, за исключением случаев, когда из контекста явно следует, что присутствует один и только один элемент. Таким образом, неопределенный артикль «а» или «an» обычно означает «по меньшей мере, один», например, «растение» также относится к нескольким клеткам растения и т.д. Аналогичным образом, «плод» или «растение» также относится к множеству фруктов и растений.

По тексту настоящей заявки термин «растение» включает в себя 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, пригодные или непригодные для заготовки плоды, листья, цветы, пыльники и т.д.), растительные клетки, растительные протопласты, культуры тканей растительных клеток, из которых можно регенерировать целые растения, растительные каллусы, скопления растительных клеток, трансплантаты растений,

сеянцы, неповрежденные растительные клетки в растениях, клоны растений или растения в рамках микроклональное размножения или части растений, такие как черенки растений, зародыши, пыльца, пыльники, семяпочки, плоды (например, собранные ткани или органы), цветы, листья, семена, клонально размноженные растения, корни, стебли, кончики корней, прививки (привои и/или корневища) и т.д. Также сюда входят растения на любой стадии развития, например, саженцы, незрелые и зрелые растения, и т.д. «Семена растения» относятся либо к семенам, из которых можно вырастить растение, либо к семенам, полученным на растении после самоопыления или перекрестного опыления.

По тексту настоящей заявки термин «сорт» или «культурный сорт» означает группу растений в пределах одного ботанического таксона самого низкого известного ранга, который может быть определен посредством выражения характеристик, обусловленных генотипом или сочетанием генотипов.

Термин «аллель(-и)» означает любую из одной или нескольких альтернативных форм гена в конкретном локусе, например, локус *CLHWS* (где расположен ген *CLHWS*; аллели гена могут быть аллелями дикого типа, обозначенными *CLHWS* или мутантными аллелями, обозначенными *Clhws*), при этом все указанные аллели относятся к одному признаку или характеристике в определенном локусе (например, образование мужских цветков). В диплоидной клетке организма аллели данного гена расположены в определенном месте или локусе (ряде локусов) на хромосоме. На каждой хромосоме пары гомологичных хромосом присутствует один аллель. Диплоидные виды растений могут содержать большое количество различных аллелей в определенном локусе. Это могут быть одинаковые (гомозиготные) аллели гена или два разных (гетерозиготных) аллеля, например, две одинаковые копии мутантного аллеля *Clhws* (т.е. *Clhws/Clhws*) или одна копия мутантного аллеля *Clhws* и одна копия аллели дикого типа (т.е. *Clhws/CLHWS*). Аналогичным образом, триплоидное растение считается гомозиготным по данному гену, если оно имеет три идентичных аллеля гена (например, три копии мутантного аллеля *Clhws*, т.е. *Clhws/Clhws/Clhws*), а тетраплоидное растение считается гомозиготным по этому гену, если оно имеет четыре идентичных аллеля гена, например, четыре копии мутантного аллеля *Clhws*.

«Ген *CLHWS*» – это единственный рецессивный ген, идентифицированный у культурного арбуза на хромосоме 5, который при мутации приводит к

фенотипическому изменению: i) развиваются лишь мужские цветки, или развивается больший процент мужских цветков, или развивается большее соотношение мужских и женских цветков, чем в гомозиготном растении дикого типа и, кроме того, при необходимости, ii) мужские цветки часто, но не всегда, имеют сросшиеся лепестки или другой внешний вид мужских цветков и/или iii) растение имеет листья различной формы, например, более широкие листья с выраженными долями или «измененную форму листьев». *ClHWS* – это функциональный аллель дикого типа (ДТ), присутствующий в нормальных культурных растениях арбуза (на растении развиваются как мужские, так и женские цветки в определенных соотношениях, имеющие несросшиеся лепестки и нормальную форму листьев), а *Clhws* – это мутантный аллель, приводящий к фенотипическому изменению, по меньшей мере, по приведенному выше пункту i), когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме в диплоидном растении (*Clhws/Clhws*). В одном аспекте ген *ClHWS* представляет собой ген, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 или кодирующий белок, который содержит, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, при попарном выравнивании, например, с использованием Needle. Специалистами отмечено, что выраженность фенотипических изменений, вызванных мутантным аллелем *Clhws* может в незначительной степени варьироваться в зависимости от конкретной мутации в аллеле и/или фоновом генотипе линии арбуза. Так, например, в одном фоновом генотипе в течение вегетационного цикла не могут развиваться женские цветки, в то время как в другом фоновом генотипе развивается очень малое количество женских цветков, например, на поздних стадиях вегетационного цикла.

«Ген множественного разветвления» представляет собой одиночный рецессивный ген, идентифицированный у культивируемого арбуза на хромосоме 8, мутация которого приводит к фенотипическому изменению, в количестве 45 или более вторичных ветвей, формирующихся, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме. У арбузов и других тыквенных основной стебель разрастается и образует первичные боковые ветви. На первичных боковых ветвях растение образует вторичные боковые ветви. Такие вторичные ветви подсчитывают, начиная с 90 см от кончика/бокового побега основного стебля до кончика/бокового побега. Таким образом, формирование вторичных ветвей в одном аспекте измеряется путем подсчета количества вторичных ветвей, начиная с расстояния 90 см от кроны до

кончика/бокового побега. Это выполняется для нескольких (не менее 5, 6, 7, 8, 9, 10) растений линии, после чего подсчитывают среднее количество второстепенных ветвей для каждой линии.

«F1, F2, F3 и т.д.» относится к последовательным родственным поколениям, сформировавшимся после скрещивания двух родительских растений или родительских линий. Растения, выращенные из семян, полученных путем скрещивания двух растений или линий, называются поколением F1. Самоопыление растений F1 приводит к образованию поколения F2 и т.д.

«Гибридное растение F1» (или гибридное семя F1) – это поколение, полученное в результате скрещивания двух инбредных родительских линий. Таким образом, гибридные семена F1 – это семена, из которых вырастают гибридные растения F1. Гибриды F1 более энергичны и обладают более высокой урожайностью за счет гетерозиса. Инбредные линии по существу являются гомозиготными по большинству локусов генома.

«Линия растения» или «линия селекции» относится к растению и его потомству. По тексту настоящей заявки термин «инбредная линия» относится к линии растений, которая неоднократно подвергалась самоопылению и является почти гомозиготной. Таким образом, «инбредная линия» или «родительская линия» относится к растению, которое претерпело несколько поколений (например, по меньшей мере, 5, 6, 7 или более) инбридинга, в результате чего была получена линия растения с высокой однородностью.

Термин «ген» означает (геномную) последовательность ДНК, содержащую область (транскрибируемую область), которая транскрибируется в молекулу информационной РНК (мРНК) в клетке, и функционально связанную регуляторную область (например, промотор). Примером является ген *CINWS* по изобретению. Таким образом, разные аллели гена представляют собой разные альтернативные формы гена, которые могут иметь форму, например, различия в одном или нескольких нуклеотидах последовательности геномной ДНК (например, в последовательности промотора, последовательностях экзонов, последовательностях интронов и т.д.), мРНК и/или аминокислотной последовательности кодируемого белка.

«Мутантный аллель *Clhws*» или «аллель *Clhws*» по тексту настоящей заявки обозначает мутантный аллель *ClHWS* ген на хромосоме 5 арбуза, который вызывает у растения фенотипическое изменение (по меньшей мере по п. i), описанное в других разделах настоящей заявки), когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме. Мутация в мутантном аллеле может представлять собой любую мутацию или комбинацию мутаций, включая делеции, усечения, вставки, точечные мутации, бессмысленные мутации, ошибочные смысловые мутации или несинонимичные мутации, мутации сайта сплайсинга, мутации сдвига рамки считывания и/или мутации в одной или нескольких регуляторных последовательностях, таких как последовательность промотора или последовательности энхансера или сайленсера. В одном аспекте мутантный аллель *Clhws* представляет собой мутантный аллель гена *ClHWS*, отличающийся тем, что ген *ClHWS* представляет собой ген, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 или кодирующий белок, который содержит, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 (при парном выравнивании).

«Аллель дикого типа *ClHWS* или «аллель *ClHWS* по тексту настоящей заявки обозначает функциональный аллель гена *ClHWS*, который обеспечивает у растения нормальное развитие как мужских, так и женских цветков в определенных соотношениях, нормальную форму листьев и несросшиеся лепестки цветков (см. также фигуры). Аллель дикого типа *ClHWS* встречается у любого коммерческого сорта арбуза (например, сорта Nunhems Premium F1, Montreal F1 и др.) В одном аспекте аллель дикого типа *ClHWS* представляет собой аллель дикого типа гена *ClHWS*, отличающийся тем, что ген *ClHWS* представляет собой ген, кодирующий белок последовательности SEQ ID NO: 1 или кодирующий белок, который содержит, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 (при парном выравнивании).

«Мутантный аллель множественного разветвления» по тексту настоящей заявки обозначает мутантный аллель гена арбуза, который приводит к тому, что в растении арбуза развивается 45 или более вторичных ветвей в случаях, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме (также такой тип роста именуется «ветвление»). Мутантный аллель множественного разветвления, например, присутствует в сорте Sidekick. Он включает в себя, например, последовательность SEQ ID NO: 10 в геноме, которая кодирует белок SEQ ID NO: 9.

Другие мутантные аллели множественного разветвления могут быть получены, например, методами на основе TILLING или Crispr.

«Аллель множественного разветвления дикого типа» по тексту настоящей заявки обозначает функциональный аллель гена, который заставляет растение сформировать нормальное количество вторичных ветвей. Аллель дикого типа встречается у любого товарного сорта арбуза (например, сорта Nunhems Premium F1, Montreal F1 и других). В одном аспекте изобретения сильно разветвленный аллель дикого типа представляет собой аллель дикого типа гена множественного разветвления, при этом ген представляет собой ген, кодирующий белок SEQ ID NO: 11 или кодирующий белок, который содержит, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11 (при парном выравнивании, например, с использованием Needle).

Термин «локус» (множественное число – «локусы») означает определенное место или места или участок на хромосоме, где находится, например, ген или генетический маркер. Таким образом, локус C1HWS – это место в геноме арбуза, где находится мутантный аллель и/или аллель дикого типа гена C1HWS. Локус C1HWS – это локус на хромосоме 5 культивируемого арбуза (с использованием распределения хромосом опубликованного генома арбуза, доступного в сети Интернет по адресу cucurbitgenomics.org в разделе «Арбуз: геном», «Чарльстон Грей»), т.е. *C1hws* был получен в геноме культивируемого арбуза путем мутагенеза, а мутантный аллель *C1hws* был картирован в определенной области хромосомы 5 культивируемого арбуза.

«Индукцированные мутантные аллели» представляют собой мутантные аллели, в которых мутация(-и) индуцирована(-ы) вмешательством человека, например, путем мутагенеза с помощью физических или химических методов мутагенеза или, например, с помощью культуры ткани (как описано, например, в работе Zhang et al, Plos 9(5) e96879), включая также методы целевого редактирования генов (такие как методы на основе Crispr, TALENS и т.д.)

«Диплоидное растение» обозначает растение, вегетативную часть(-и) растения или семени, из которого могут быть выращены диплоидное растение, имеющее два набора хромосом, обозначенных по тексту настоящей заявки как 2n.

«Растение ДГ» или «растение с двойным гаплоидом» представляет собой диплоидное растение, полученное путем удвоения гаплоидного генома диплоидного растения с использованием, например, технологии *in vitro*. Таким образом, растение ДГ гомозиготно по всем локусам.

«Триплоидное растение» обозначает растение, вегетативную часть(-и) растения или семени, из которого можно получить триплоидное растение, имеющее три набора хромосом, обозначенных по тексту настоящей заявки как $3n$.

«Тетраплоидное растение» обозначает растение, вегетативную часть(-и) растения или семени, из которого можно получить тетраплоидное растение, имеющее четыре набора хромосом, обозначенных по тексту настоящей заявки как $4n$.

«Полиплоидное растение» обозначает растение, имеющее более высокую плоидность, чем диплоид, т.е. триплоид ($3n$), тетраплоид ($4n$), гексаплоид ($6n$), октаплоид ($8n$) и т.д.

«Растение-опылитель» или «опылитель» обозначает диплоидное (инбредное или гибридное) растение или его части (например, его пыльцу или привой), пригодному для использования в качестве опылителя для стимулирования завязывания плодов на триплоидных растениях. Таким образом, растение-опылитель способно обеспечить хорошее завязывание плодов (и хорошему урожаю триплоидных плодов) нормальных триплоидных растений (содержащих три копии аллеля дикого типа C1HWS), позволяя получить соответствующее количество пыльцы в соответствующее время суток и на протяжении соответствующего периода времени.

«Гибридное триплоидное растение» или «триплоид F1» или «триплоидный гибрид» представляет собой триплоидное растение, выращенное из гибридных триплоидных семян, полученных в результате перекрестного оплодотворения мужского диплоидного родителя с женским тетраплоидным родителем. Мужской родителем используется для стимуляции завязывания плодов и формирования семян у тетраплоидного женского родителя, в результате чего получают плоды, содержащие гибридные триплоидные семена F1. И родительская мужская, и женская линии, используемые для получения триплоидных семян F1, являются инбредными, так что каждая родительская линия почти гомозиготна и стабильна.

«Бессемянные плоды» – это плоды, не содержащие жизнеспособных зрелых семян. Плод может содержать одну или более маленьких съедобных белых семяпочек. При необходимости, плод может содержать несколько коричневых или черных семян, но они не являются жизнеспособными. Жизнеспособные зрелые семена – это семена, которые можно прорастить в почве при соответствующих условиях и получить из них растения.

«Интерплатнация» означает сочетание двух или более типов семян и/или трансплантаты, высеянных или пересаженных на одном и том же поле, особенно посев и/или пересадку опылителей на том же поле, что и триплоидные гибридные растения (для получения бессемянных плодов на триплоидные растения и образования диплоидных плодов на растениях-опылителях). Например, опылитель можно либо посадить в отдельных рядах, либо пересадить вместе с триплоидными растениями в одном ряду (например, на холмиках внутри каждого ряда). Опылители также можно сажать между рядами триплоидов. Также перед посевом можно смешивать семена опылителей и триплоидных гибридов, что приводит к произвольному посеву. Трансплантаты триплоидных гибридных растений и/или растений-опылителей также могут содержать подвои другого растения. Подходящие подвои известны в данной области техники. Растения арбуза с другим подвоем называют «привитыми».

«Посадка» или «посаженный» обозначает посев (прямой посев) или пересадку рассады (саженцев) в поле механическим или ручным способом.

«Вегетативное размножение» или «клональное размножение» относится к размножению растений из вегетативной ткани, например, путем размножения *in vitro* или прививки (с использованием привоев и подвоев). Размножение *in vitro* включает в себя культуру клеток или тканей *in vitro* и регенерация целого растения из культуры *in vitro*. Прививка предполагает размножение исходного растения путем прививки на подвой. Таким образом, клоны (т.е. генетически идентичные вегетативные размножения) исходного растения могут быть созданы либо *in vitro*, либо путем прививки. «Клеточная культура» или «культура ткани» относится к культуре клеток или тканей растения *in vitro*. «Регенерация» обозначает формирование растения из культуры клеток или культуры ткани или вегетативного размножения. «Неразмножающаяся клетка» обозначает клетку, которая не может быть регенерирована в целое растение.

«Рецессивный» относится к аллелю, который выражает свой фенотип (например, развиваются преимущественно мужские цветы), когда в диплоидном геноме отсутствует доминантный аллель, т.е. когда он является гомозиготным в диплоидном растении. Мутантный аллель *Clhws* приводит к тому, что для растения характерно фенотипическое изменение (описанное в других источниках), если он присутствует в двух копиях в диплоидном растении, необязательно в четырех копиях в тетраплоидном растении или в двух или трех копиях в триплоидном растении или в соответствующем количестве копий в другом полиплоидном растении. Доминантный аллель по тексту настоящей заявки также именуется аллелем дикого типа (ДТ).

«Культивированный арбуз» или «*Citrullus lanatus*» по тексту настоящей заявки обозначает *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris* или *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai subsp. *vulgaris* (Schrad.), обладающий хорошими агротехническими характеристиками, особенно дающий товарные плоды хорошего качества и однородности.

«Дикий арбуз» по тексту настоящей заявки обозначает *Citrullus lanatus* ssp. *lanatus* и *Citrullus lanatus* ssp. *mucosospermus*, дающие плоды низкого качества и плохой однородности.

«Маркер ОНП» обозначает однонуклеотидный полиморфизм, например, между мутантный аллель *Clhws* и аллель дикого типа *Clhws*. Например, SEQ ID NO: 5 представляет собой последовательность, содержащую ОНП в нуклеотиде 101, при этом присутствие «G» (гуанина) указывает на присутствие аллеля дикого типа *Clhws*, а наличие «A» (аденина) указывает на наличие мутантного аллеля, который кодирует белок SEQ ID NO: 2 (мутация W204STOP). При помощи маркерного анализа ОНП, который позволяет различать мутантный аллель и аллель дикого типа гена *Clhws* (т.е. аллель-специфического анализа) можно проверить ткани, части растений или полученную из них ДНК на наличие мутантного аллеля.

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

«Участок хромосомы, содержащий мутантный аллель *Clhws*» обозначает геномную область, например, хромосому 5 культурного арбуза, область которого содержит мутантный аллель *Clhws*. Наличие аллеля можно определить фенотипически и/или по наличию одного или нескольких молекулярных маркеров, например, маркеров ОНП или других маркеров, связанных с мутантным аллелем *Clhws* или предпочтительно маркеры, позволяющие различать разные аллели *Clhws*, или геномной последовательности самой последовательности аллеля (например, секвенирование аллелей). Маркер «связан с аллелем *Clhws*», если он физически связан с аллелем. «Аллель-специфический маркер» представляет собой маркер, который специфичен для конкретного аллеля (например, конкретного мутантного аллеля) и, таким образом, позволяет различать, например, мутантный аллель и аллель дикого типа.

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

«Брикс», или «градус Брикса», или «° Брикса» относится к среднему общему содержанию растворимых сухих веществ, измеренному на нескольких зрелых плодах с помощью рефрактометра. Предпочтительно вычисляют среднее значение, по меньшей мере, трех плодов, измеренное между центром и кожурой разрезанного плода.

«Товарный» в отношении качества плодов означает, что плоды арбуза пригодны для продажи для потребления в свежем виде, имеют хороший вкус (без посторонних привкусов), степень по шкале Брикса не менее 9,0, предпочтительно не менее 10,0 или не менее 11,0 и предпочтительно также однородный 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 темный красный (например, сорт Dixie Lee).

«Однородный цвет мякоти плода» означает, что цвет зрелых плодов, если их разрезать посередине (среднюю часть), равномерно распределяется по мякоти плода,

т.е. не является пятнистым. Таким образом, красный плод имеет красную окраску по всей мякоти и не содержит белых пятен. Примером плода однородной красной окраски является диплоидный сорт Premium F1 (Nunhems).

«Физическое расстояние» между локусами (например, между молекулярными маркерами и/или между фенотипическими маркерами) на одной и той же хромосоме представляет собой фактическое расстояние, выражаемое в основаниях или парах оснований (п.о.), килооснованиях или парах килооснований (ко), мегабазах или парах мегабаз (Мб).

«Генетическое расстояние» между локусами (например, между молекулярными маркерами и/или между фенотипическими маркерами) на одной и той же хромосоме измеряется частотой кроссинговера или частотой рекомбинации (ЧР) и указывается в сантиморганах (сМ). Один сМ соответствует частоте рекомбинации порядка 1%. Если рекомбинанты отсутствуют, ЧР равна нулю и локусы либо физически очень близки друг к другу, либо идентичны. Чем дальше друг от друга расположены два локуса, тем выше ЧР.

«Однородность» или «однородный» относится к генетическим и фенотипическим характеристикам линии или сорта растения. Инбредные линии генетически весьма однородны, поскольку их получают в результате нескольких поколений инбридинга. Аналогичным образом, гибриды F1 и триплоидные гибриды, полученные из таких инбредных линий, весьма однородны по своим генотипическим и фенотипическим свойствам и характеристикам.

Указывается, что генетический элемент, фрагмент интрогрессии или ген или аллель, придающие признак (например, фенотипические характеристики мутантного аллеля *Clhws*) «получен из» или может быть «получен из» или «сформирован из» или может быть «сформирован из» или «присутствует в» или «обнаружен в» растении, семени, ткани или клетке, если его можно перенести из растения или семени, в котором он присутствует, в другое растение или семя, в котором он отсутствует (например, в линию или сорт дикого типа), используя традиционные методы селекции, не приводя к фенотипическому изменению растения-реципиента, за исключением добавления признака, присущего генетическому элементу, локусу, фрагменту интрогрессии, гену или аллелю. Эти термины используются взаимозаменяемо, и генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, ген или

аллель, таким образом, могут быть перенесены в любой другой фоновый генотип, в котором отсутствует соответствующий признак. Культивируемые арбузы, содержащие генетический элемент, локус, фрагмент интрогрессии, ген или аллель (например, мутантный аллель *Clhws*) может быть сгенерирован *de novo*, например, путем мутагенеза (например, химического мутагенеза, индуцирования CRISPR-Cas и т.д.), а затем, например, скрещен с другими культурными арбузами.

«Средний» или «среднее» по тексту настоящей заявки обозначает среднее арифметическое, при этом оба термина используются взаимозаменяемо. Таким образом, термин «среднее» или «среднее» обозначает среднее арифметическое результатов нескольких измерений. Специалисту в данной области известно, 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) измеряют, предпочтительно в произвольно сформированных экспериментальных схемах с несколькими повторами и подходящими контрольными растениями, выращенными в тех же условиях в рамках одного и того же эксперимента. «Статистически значимое» или «статистически существенное» отличие или «значительно отличающееся» относится к характеристике линии или сорта растений, которая, по сравнению с соответствующим контрольным растением демонстрирует статистически значимое различие по данной характеристике (например, значение p меньше, чем 0,05, $p < 0,05$, с использованием анализа вариантов) из (среднего значения) контрольного растения.

Термин «традиционные методы селекции» по тексту настоящей заявки включает в себя скрещивание, обратное скрещивание, самоопыление, селекцию, получение двойных гаплоидов, удвоение хромосом, спасение эмбрионов, слияние протопластов, селекцию с помощью маркеров, мутационную селекцию и т.д., все из которых известны специалисту в области селекции, с помощью которого, например, может быть получена, идентифицирована или передана хромосома 5, содержащая мутантный аллель *Clhws*.

«Обратное скрещивание» относится к методу разведения, при котором (одионый) признак, такой как фенотипические изменения, привнесенные мутантным аллелем *Clhws*, может быть передан от одного (часто низшего) фонового генотипа (также именуемого «донором») другому (часто более высокому) фоновому

генотипу (также именуемого «рекуррентным родителем»). Потомство от скрещивания (например, растения F1, полученного путем скрещивания, например, донора с рекуррентным родительским арбузом, или растения F2, или растения F3 и т. д., полученного в результате самоопыления F1), подвергают «обратному скрещиванию» с родителем, например, с превосходным фоновым генотипом. После повторного обратного скрещивания признак одного (часто низшего) фонового генотипа будет включен в другой (зачастую более высокий) фоновый генотип.

«Маркер-вспомогательная селекция» или «MAS» – это процесс использования присутствия молекулярных маркеров (таких как маркеры ОНП), которые генетически и физически связаны с определенным локусом или с определенной областью хромосомы или аллель-специфическими маркерами, для селекции растений на наличие определенного локуса, региона или аллеля. Например, молекулярный маркер, генетически и физически связанный с мутантным аллелем *Cllhws* или аллель-специфический маркер можно использовать для обнаружения и/или селекции, например, растения арбуза или частей растений, содержащих аллель *Cllhws*. Чем теснее связь молекулярного маркера с локусом, тем менее вероятно, что маркер отделится от локуса посредством мейотической рекомбинации. Аналогичным образом, чем теснее два маркера связаны друг с другом, тем менее вероятно, что эти два маркера будут отделены друг от друга (и тем более вероятно, что они будут совместно отделяться как единое целое). Аллель-специфические маркеры являются предпочтительными маркерами, поскольку они осуществляют непосредственную селекцию аллеля.

Молекулярный маркер (или последовательность, содержащая молекулярный маркер) внутри 5 Мб, 3 Мб, 2,5 Мб, 2 Мб, 1 Мб, 0,5 Мб, 0,4Мб, 0,3Мб, 0,2Мб, 0,1 Мб, 74kb, 50kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb или менее другого маркера (или последовательности, содержащей молекулярный маркер) или локуса, относится к маркеру, который физически расположен внутри 5 Мб, 3 Мб, 2,5 Мб, 2 Мб, 1 Мб, 0,5 Мб, 0,4Мб, 0,3Мб, 0,2Мб, 0,1 Мб, 74 т.о., 50 т.о., 20 т.о., 10 т.о., 5 т.о., 2 т.о., 1 т.о. или менее, участка геномной ДНК, фланкирующего маркер (т.е. по обе стороны от маркера).

«LOD-балл» (логарифм величины вероятностей (по основанию 10)) относится к статистическому тесту, часто используемому для анализа сцепления в популяциях животных и растений. LOD-балл позволяет сравнить вероятность

получения тестовых данных, если два локуса (локус молекулярного маркера и/или локус фенотипического признака) действительно связаны, с вероятностью чисто случайного наблюдения тех же данных. Положительные значения LOD-балла свидетельствуют о наличии связи, а показатель LOD выше 3,0 считается подтверждением сцепления. LOD-балл +3 указывает на вероятность 1000 к 1, что наблюдаемая связь возникла неслучайно.

«Трансген» или «химерный ген» обозначает генетический локус, содержащий последовательность ДНК, такую как рекомбинантный ген, который был введен в геном растения путем трансформации, такой трансформация при помощи агробактерий. Растение, содержащее трансген, стабильно интегрированный в его геном, именуется «трансгенным растением».

«Изолированная нуклеотидная последовательность» обозначает нуклеотидную последовательность, которая больше не находится в природной среде, из которой она была выделена, например, нуклеотидную последовательность в бактериальной клетке-хозяине или в растительном ядерном или пластидном геноме. Под «последовательностью» по тексту настоящей заявки понимается молекула, имеющая такую последовательность, например, молекула нуклеиновой кислоты.

«Клетка-хозяин», «рекомбинантная клетка-хозяин» или «трансформированная клетка» – это термины, относящиеся к новой отдельной клетке (или организму), возникающей в результате введения, по меньшей мере, одной молекулы нуклеиновой кислоты в указанную клетку. Клетка-хозяин представляет собой предпочтительно растительную или бактериальную клетку. Клетка-хозяин может содержать нуклеиновую кислоту в виде внехромосомно (эпизомальной) реплицирующейся молекулы или содержать нуклеиновую кислоту, включенную в ядерный или пластидный геном клетки-хозяина, или в виде введенной хромосомы, например, минихромосомы.

«Идентичность последовательностей» и «сходство последовательностей» можно определить путем выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритмов глобального или локального выравнивания. Последовательности могут именоваться «существенно идентичными» или «существенно подобными», когда они оптимально выровнены,

например, с помощью программ GAP или BESTFIT или программы Emboss «Needle» (с использованием параметров по умолчанию, см. ниже) имеют общий, по меньшей мере, определенный минимальный процент идентичности последовательности (см. определение ниже). В этих программах используется алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей длине, что делает количество совпадений максимальным, а количество пробелов – минимальным. Обычно используются параметры по умолчанию, со штрафным баллом на внесение делеции = 10 и штрафным баллом на продолжение делеции = 0,5 (как для выравнивания нуклеотидных, так и белковых последовательностей). Используемая по умолчанию при подсчете нуклеотидов матрица замен – DNAFULL, а при подсчете белков – Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 10915-10919). Для выравнивания последовательностей и определения процентной идентичности последовательностей могут использоваться, например, компьютерные программы, такие как Emboss (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/Emboss_needle/). При необходимости, сходство или идентичность последовательностей можно определить путем поиска в базах данных, таких как FASTA, BLAST и т.д., но совпадения следует извлечь и попарно выровнять для сравнения идентичности последовательностей. Два белка, два белковых домена или две последовательности нуклеиновой кислоты обладают «существенной идентичностью последовательностей», если в процентном выражении идентичность последовательностей составляет, по меньшей мере, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% или более (как определено с помощью «иглы» Emboss с использованием параметров по умолчанию, т.е. штрафной балл на внесение делеции = 10, штрафной балл на продолжение делеции = 0,5, с использованием оценочной матрицы DNAFULL для нуклеиновых кислот и Blosum62 для белков).

В случаях, когда указано, что последовательность нуклеиновой кислоты (например, ДНК или геномной ДНК) имеет «существенную идентичность последовательности» по отношению к эталонной последовательности или, по меньшей мере, на 80%, например, по меньшей мере, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,9% идентична последовательности нуклеиновой кислоты эталонной последовательности, в одном варианте реализации указанная нуклеотидная последовательность считается по существу идентичной данной нуклеотидной последовательности и может быть идентифицирована на основе

строгих условий гибридизации. В другом варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит одну или более мутаций, по сравнению с данной нуклеотидной последовательностью, но ее все же можно идентифицировать на основе строгих условий гибридизации.

«Строгие условия гибридизации» можно использовать для идентификации нуклеотидных последовательностей, которые по существу идентичны данной нуклеотидной последовательности. Строгие условия зависят от последовательности и отличаются в разных ситуациях. Обычно строгие условия выбирают таким образом, чтобы они были примерно на 5°C ниже температуры плавления (T_m) для конкретных последовательностей при определенной ионной силе и pH. T_m представляет собой температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% целевой последовательности гибридизуется с абсолютно совпадающим зондом. Обычно выбираются строгие условия, при которых концентрация соли составляет порядка 0,02 моля при pH 7 и температуре, по меньшей мере, 60°C. Снижение концентрации соли и/или повышение температуры повышает жесткость. Строгие условия гибридизации РНК-ДНК (нозерн-блоттинг с использованием зонда размером, например, 100 нуклеотидов) включают в себя, например, такие условия, которые предусматривают, по меньшей мере, одну промывку в 0,2X SSC при 63°C в течение 20 минут или аналогичные условия. Строгими условиями гибридизации ДНК-ДНК (саузерн-блоттинг с использованием зонда, например, 100 нуклеотидов) являются, например, те, которые включают в себя, по меньшей мере, одну промывку (обычно 2) в 0,2X SSC при температуре, по меньшей мере, 50°C, обычно порядка 55°C, в течение 20 мин или в аналогичных условиях.

«Поколение M1» или «растения M1» в контексте настоящего изобретения относятся к первому поколению, которое получено непосредственно в результате мутагенной обработки. Растение, выращенное из семян, обработанных мутагеном, например, является представителем поколения M1.

«Поколение M2» или «растение M2» относятся здесь к поколению, полученному в результате самоопыления поколения M1. Растение, выращенное из семян, полученных от самоопыляемого растения M1, представляет собой растение M2. M3, M4 и т. д. относятся к дальнейшим поколениям, полученным после самоопыления.

«Кодирующая последовательность мРНК» имеет общее значение по тексту настоящей заявки. Кодирующая последовательность мРНК соответствует соответствующей последовательности ДНК, кодирующей (кДНК) последовательность гена/аллеля, за исключением того, что тимин (Т) заменен на урацил (U).

«Мутация» в молекуле нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) представляет собой изменение одного или нескольких нуклеотидов, по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа, например, путем замены, делеции или вставки одного или нескольких нуклеотидов. Примерами такой мутации являются точечная мутация, нонсенс-мутация, миссенс-мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация сдвига рамки считывания или мутация в регуляторной последовательности.

«Молекула нуклеиновой кислоты» должна иметь значение, принятое для данного термина в данной области техники. Она состоит из нуклеотидов, содержащих любой из сахаров – дезоксирибозу (ДНК) или рибозу (РНК).

«Точечная мутация» – это замена одного нуклеотида или вставка или делеция одного нуклеотида.

«Нонсенс-мутация» представляет собой (точечную) мутацию в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, при которой кодон в молекуле нуклеиновой кислоты заменяется на стоп-кодон. Это приводит к присутствию преждевременного стоп-кодона в мРНК и трансляции усеченного белка. Усеченный белок может иметь сниженную или отсутствующую функцию.

«Миссенс или несинонимичная мутация» представляет собой (точечную) мутацию в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, при которой кодон изменяется для кодирования другой аминокислоты. Полученный белок может иметь сниженную или отсутствующую функцию.

«Мутация сайта сплайсинга» представляет собой мутацию в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, в результате которой изменяется сплайсинг РНК пре-мРНК, в результате чего мРНК имеет иную нуклеотидную последовательность, а белок имеет иную аминокислотную последовательность, по сравнению с диким типом. Полученный белок может иметь сниженную или отсутствующую функцию.

«Мутация сдвига рамки считывания» представляет собой мутацию в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, в результате которой изменяется рамка считывания мРНК, что приводит к образованию другой аминокислотной последовательности. Полученный белок может иметь сниженную или отсутствующую функцию.

«Делеция» в контексте изобретения означает, что в любом месте данной последовательности нуклеиновой кислоты отсутствует, по меньшей мере, один нуклеотид, по сравнению с нуклеиновой последовательностью соответствующей последовательности дикого типа или, по сравнению с аминокислотной последовательностью соответствующей последовательности (дикого типа) в любом месте данной аминокислотной последовательности отсутствует, по меньшей мере, одна аминокислота.

«Усечение» означает, что, по меньшей мере, один нуклеотид на 3'-конце, или 5'-конце нуклеотидной последовательности отсутствует, по сравнению с нуклеиновой последовательностью соответствующей последовательности дикого типа или, что, по меньшей мере, одна аминокислота кислота, но предпочтительно не менее 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более аминокислот, либо, по сравнению с аминокислотой на N-конце, либо на C-конце белка отсутствуют кислотная последовательность соответствующего белка дикого типа. 5'-конец определяется кодоном ATG, используемым в качестве стартового кодона при трансляции соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты дикого типа.

«Замена» означает, что, по меньшей мере, один нуклеотид в последовательности нуклеиновой кислоты или одна аминокислота в белковой последовательности отличается от соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты дикого типа или соответствующей аминокислотной последовательности дикого типа, соответственно, вследствие замены нуклеотида в кодирующей последовательности соответствующего белка.

«Вставка» означает, что последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность белка содержит, по меньшей мере, один дополнительный нуклеотид или аминокислоту, по сравнению с соответствующей последовательностью нуклеиновой кислоты дикого типа или соответствующей аминокислотной последовательностью дикого типа соответственно.

«Преждевременно зрелый стоп-кодон» в контексте настоящего изобретения означает, что стоп-кодон, который присутствует в кодирующей последовательности (cds), которая находится ближе к стартовому кодону на 5'-конце, по сравнению со стоп-кодоном соответствующей кодирующей последовательности дикого типа.

«Мутация в регуляторной последовательности», например, в промоторе или энхансере гена представляет собой изменение одного или нескольких нуклеотидов, по сравнению с последовательностью дикого типа, например, путем замены, делеции или вставки одного или нескольких нуклеотидов, что приводит, например, к уменьшению или отсутствию транскрипта мРНК формирующегося гена.

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

«Мутантный белок» по тексту настоящей заявки обозначает белок, содержащий одну или более мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, при этом мутация приводит к (кодированию молекулы мутантной нуклеиновой кислоты) возникновению белка со сниженной или отсутствующей функцией, как, например, измеримой функцией *in vivo*, например, по фенотипу, обусловленному мутантным аллелем.

«Трехмерная структура дикого типа» или «складывание белка дикого типа» обозначает сворачивание белка дикого типа *in vivo* для выполнения обычной функции *in vivo*. «Модифицированная трехмерная структура или модифицированная укладка белка» обозначает мутантный белок, имеющий укладку, которая отличается от белка дикого типа, что снижает или отменяет его нормальную функцию или активность *in vivo*, то есть белок имеет сниженную или отсутствующую функцию. Укорочение белка также дает модифицированную трехмерную структуру. Изменение трехмерной структуры можно прогнозировать, используя, например, программы, такие как RaptorX, равно как и выполнять сравнение прогнозируемой структуры белка дикого типа с прогнозируемой модифицированной структурой белка.

В контексте настоящего изобретения «снижение активности» белка означает снижение активности белка Clhws, по сравнению с соответствующей растительной

клеткой дикого типа или соответствующим растением дикого типа. Снижение должно в одном аспекте включать полный нокаут или нокдаун экспрессии гена, или возникновение отсутствующей или сниженной функции белка *Clhws*, например, мутантный белок *Clhws* мог утратить или снизить функцию, по сравнению с функциональным белком дикого типа *ClHWS*. Снижение активности может представлять собой снижение экспрессии гена, кодирующего белок *ClHWS* (также именуемый нокдауном), или нокаут экспрессии гена, кодирующего белок *ClHWS*, и/или уменьшение количества белка *ClHWS* в клетках или снижение или утрата функции в активности белка *Clhws* в клетках.

В контексте настоящего изобретения термин «растительная клетка дикого типа» или «растение дикого типа» означает, что они содержат аллели дикого типа *ClHWS*, а не мутантные аллели *Clhws*. Таким образом, растение дикого типа или растительная клетка дикого типа представляет собой растение или растительную клетку, содержащую полностью функциональные гены *ClHWS*, кодирующие полнофункциональные белки *ClHWS* (также именуемые белками дикого типа *ClHWS*), например, применительно к растениям арбуза или растительным клеткам – диплоидное растение арбуза, вырабатывающее белок SEQ ID NO: 1 (или вариант белка дикого типа, который, по меньшей мере, на 90% идентичен последовательности SEQ ID NO: 1) и формирующее нормальные цветки, нормальное соотношение мужских и женские цветки, нормальные лепестки и листья.

«Нокаут» или «полный нокаут» обозначает, что экспрессия соответствующего гена больше не обнаруживается.

«Отсутствующая функция», или «сниженная функция», или «снижение функции» в контексте настоящего изобретения означает, что белок, хотя и возможно присутствует в количествах, равных или аналогичных соответствующему белку дикого типа, больше не дает нормального эффекта, т.е. в случае с мутантными аллелями, кодирующими такой белок, когда они присутствуют в гомозиготной форме в диплоидном растении, растение вызывает фенотипическое изменение, описанное в разделах местх настоящей заявки.

«Консервативный домен» обозначает консервативные белковые домены, такие как «домен F-box». В белке арбуза *ClHWS* последовательности SEQ ID NO: 1 'домен F-box' обнаружен среди аминокислот 45 – 83 или эквивалентных

аминокислот в белке, который, по меньшей мере, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичен последовательности с SEQ ID NO: 1. Консервативные домены могут, например, присутствовать в базе данных консервативных доменов NCBI (сеть Интернет, ncbi.nlm.nih.gov/cdd).

«Направленное редактирование генов» обозначает методы, с помощью которых можно модифицировать эндогенные гены-мишени, например, один или несколько нуклеотидов могут быть вставлены, заменены и/или делетированы, например, в промоторе или кодирующей последовательности. Например, методы на основе CRISPR, такие как редактирование генов *Crispr-Cas9*, *Crispr-Cpf1* редактирование генов или более современные методы, именуемые «редактирование оснований» или «редактирование праймеров», могут использоваться для модификации эндогенных генов-мишеней, таких как эндогенный ген дикого типа *SlHWS* в арбузе.

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

«Олигонуклеотиды» или «олигонуклеотиды» или «олигонуклеотидные праймеры или зонды» представляют собой короткие одноцепочечные полимеры нуклеиновой кислоты, например, не менее 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более нуклеотидов в длину. Олигонуклеотиды могут быть немодифицированными или модифицированными различными химическими методами в зависимости от их предполагаемого использования, например, добавлением 5'- или 3'-фосфатных групп для обеспечения возможности лигирования или блокирования соответственно, мечения радионуклидами или флуорофорами и/или гасителями люминесценции для использования в качестве зондов, включением тиола, амина или других реакционноспособных фрагментов для обеспечения ковалентного связывания функциональных молекул, таких как ферменты, и расширения с другими линкерами и спейсерами, обладающими различными функциями. Чаще всего применяются ДНК-олигонуклеотиды, но при этом также доступны олигонуклеотиды РНК. Длина олигонуклеотида обычно обозначается добавлением суффикса -мер. Например, олигонуклеотид с 19 нуклеотидами (основаниями) называется 19-мером. В большинстве случаев олигонуклеотиды

предназначены для спаривания оснований с цепью ДНК или РНК. Чаще всего олигонуклеотиды используются в качестве праймеров для ПЦР (полимеразной цепной реакции). Праймеры конструируют так, чтобы, по меньшей мере, часть их последовательности была комплементарна последовательности, предназначенной для амплификации. Оптимальная длина праймера в части комплементарной последовательности составляет, например, от 18 до 22 нуклеотидов. Оптимальные последовательности праймеров для ПЦР обычно определяются с помощью программного обеспечения для разработки праймеров.

«ДНК-микрочипы» представляют собой массивы, которые содержат множество микроскопических пятен ДНК, обычно олигонуклеотидов, прикрепленных к твердой поверхности. Мишенью анализа могут быть ДНК, кДНК или кРНК. В зависимости от системы, гибридизация мишеней с конкретными пятнами обнаруживается с помощью флуоресценции, хемилюминесценции или коллоидного серебра или золота. Микрочипы используются в ряде случаев, таких как одновременное измерение экспрессии большого количества генов, позволяющее анализировать экспрессию генов в масштабах всего генома, а также исследования генотипирования с использованием, например, однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) или анализа инсерционно-делеционного полиморфизма.

«Комплементарные цепи» относятся к двум нитям комплементарной последовательности и могут именоваться смысловыми (или плюсовыми) и антисмысловыми (или минусовыми) нитями в случае двухцепочечной ДНК. Смысловая/плюс-цепь обычно представляет собой транскрибируемую последовательность ДНК (или мРНК, которая образовалась при транскрипции), тогда как антисмысловая/минус-цепь представляет собой цепь, комплементарную смысловой последовательности. Для любой из последовательностей, представленных в настоящем документе, представлена только одна цепь последовательности, при этом по тексту настоящей заявки также предусмотрена комплементарная цепь данной цепи. Комплементарные нуклеотиды ДНК А комплементарны Т, а G комплементарны С. Комплементарные нуклеотиды РНК А комплементарны U, а G комплементарны С.

ФИГУРЫ

Фигура 1: Попарное выравнивание аминокислотных последовательностей белка дикого типа (ДТ) CLHWS последовательности SEQ ID NO: 1 и мутантный белок Clhws W204* последовательности SEQ ID No: 2. Домен F-box выделен жирным.

Фигура 2: Попарное выравнивание аминокислотных последовательностей между белком *Arabidopsis* HWS At3g61590 и белком ClHWS последовательности SEQ ID NO: 1. Последовательность *Arabidopsis* имеет 6 повторяющихся областей, следующих за доменом F-box, т.е. от аминокислоты 41 по 85: Kelch-участок 1 находится между аминокислотами 81 и 135, Kelch-участок 2 находится между аминокислотами 137 и 178, Kelch-участок 3 соответствует аминокислоте 196–246, Kelch-участок 4 находится между аминокислотами 251–299, Kelch-участок 5 находится между аминокислотами 302–350, Kelch-участок 6 находится между аминокислотами 352 и 401.

Фигура 3: Фотография листьев растения, содержащего мутантный аллель W204* в гомозиготной форме (фото слева), и листьев растения, содержащего аллель дикого типа *Clhws* в гомозиготной форме (фото справа).

Фигура 4: Фотография мужского цветка растения, содержащего мутантный аллель W204* в гомозиготной форме (фото слева), при этом лепестки срослись, а чашелистики частично отсутствуют. Справа нормальный мужской цветок (без сросшихся лепестков) растения, содержащего аллель дикого типа *Clhws* в гомозиготной форме (фото справа).

Фигура 5: Трехмерное (3D) моделирование структуры (raptorx.uchicago.edu/) белка дикого типа CLHWS белок с N-концевой областью (аминокислоты с 1 по 44), доменом F-box (аминокислоты с 45 по 83) и C-концевой областью с аминокислотами с 93 по 380, который включает в себя ряд бета-складок. Таким образом, белок является высокоструктурированным. У мутанта W204* большая часть бета-складок в C-концевой области отсутствует.

Фигура 6: Попарное выравнивание белка SEQ ID NO: 1 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 4) и белка SEQ ID NO: 7 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 8). F-box обозначен сплошными прямоугольниками, C-концевая область бета-складки обозначена пунктирными прямоугольниками. Мутанты в Таблице А выделены жирным и подчеркнуты.

Фигура 7: Фотография листа мутантного растения F3, содержащего мутантный аллель W204* в гомозиготной форме (фото слева), и листа растения дикого типа, содержащего аллель дикого типа Clhws (фото справа). Растение, содержащее мутантный аллель, имеет «измененную форму листа» или «более широкие листья с выраженными долями», по сравнению с диким типом.

Фигура 8: Фотография мужских цветков мутантного растения F3, содержащего мутантный аллель W204* в гомозиготной форме (две фотографии слева), и мужского цветка растения дикого типа, содержащего аллель дикого типа CLHWS (две фотографии справа). Растение, содержащее мутантный аллель, имеет мужские цветки, внешний вид которых отличается от дикого типа.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Первый вариант осуществления настоящего изобретения относится к культивируемым растениям арбуза *Citrullus lanatus*, которые содержат, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, именуемого по тексту настоящей заявки геном *Clhws*, обеспечивающий (в гомозиготной форме) изменение соотношения развивающихся мужских и женских цветков, особенно более высокий процент развития мужских цветков (или более низкий процент развития женских цветков), по сравнению с растением, гомозиготным по функциональному аллелю гена дикого типа. Таким образом, соотношение мужских и женских цветков дикого типа, или процент мужских цветков от всех цветков, изменяется у растения, содержащего мутантный аллель в гомозиготной форме, при этом женских цветков становится значительно меньше, или женские цветки не образуются вообще.

Растение арбуза, которое гомозиготно по мутантному аллелю гена *Clhws*, соответственно, в одном аспекте будет давать модифицированный (более высокий) процент мужских цветков или модифицированное (более высокое) соотношение мужских и женских цветков, по сравнению с растением дикого типа, например, 100% мужских цветков и 0% женских цветков, или 99,5%: 0,5%, 99%: 1%, 98%: 2%, 97%: 3% соотношение мужских цветков к женским цветкам, при необходимости, 96%: 4%, или от 95% до 5%, или от 94% до 6% (около 15,6: 1), или 93% к 7% (соотношение примерно 13:1), или 92% к 8% (соотношение примерно 11:1), или 91% к 9% (соотношение примерно 10:1), или 90%: 10% (соотношение примерно 9:1) мужских цветков к женским. Таким образом, соотношение мужских цветков к женским

цветкам составляет, по меньшей мере, 9:1, предпочтительно, по меньшей мере, 10:1 или более.

В одном аспекте растение арбуза, гомозиготное по мутантному аллелю гена *CIHWS* дает значительно более высокий процент мужских цветков, по сравнению с растением, гомозиготным по аллелю дикого типа, например, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% из образующихся цветков – мужские цветки.

Такой повышенный процент мужских цветков (или более высокое соотношение мужских и женских цветков) в мутантной линии можно проанализировать путем выращивания линии растений, гомозиготной по мутантному аллелю, в тех же условиях и в течение того же периода, что и линия дикого типа (гомозиготная по аллелю дикого типа) и подсчитать мужские и женские цветки, развивающиеся за данный период. Продолжительность периода может составлять определенное количество недель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более недель) или быть равной всему вегетационному периоду. Затем выполняют сравнение среднего процента мужских цветков мутантной линии и линии дикого типа. Аналогичным образом можно сравнить соотношение мужских и женских цветков между генотипом, гомозиготным по мутантному аллелю, и генотипом, гомозиготным по аллелю дикого типа. Предпочтительно генетическое происхождение двух линий схоже, например, мутантный аллель может быть подвергнут обратному скрещиванию с определенной линией, а рекуррентная родительская линия является контрольной линией (содержащей аллель дикого типа в гомозиготной форме).

В одном аспекте растение, гомозиготное по мутантному аллелю, дает 100% или 99,5% или 99% (или, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%) мужских цветков от общего числа цветков, образовавшихся в течение как минимум 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель выращивания в полевых условиях, например, в течение 4, 5 и/или 6-й недели после пересадки в поле или в течение всего периода выращивания в поле.

Семена арбуза могут, например, можно высевать в теплице, а примерно через 4 - 5 недель рассаду можно пересадить в полевые условия. Первые цветы могут появиться уже на 1-2 неделе после пересадки, при этом все растения зацветают на 4,

5, 6 неделе после пересадки. Таким образом, в одном аспекте мужские и женские цветки, развивающиеся на линии растений, гомозиготной по мутантному аллелю, и на линии растений, гомозиготной по аллелю дикого типа, можно легко подсчитать через 4, 5 и/или 6 недель после пересадки в поле. При этом можно использовать и другие периоды, например, недели 3, 4, 5, 6 и 7 после пересадки в поле, или недели 8, 9 и 10 после пересадки, либо другие указанные периоды (см. Примеры). Контрольную линию (дикого типа) и линию, содержащую мутантный аллель в гомозиготной форме, следует сравнивать в одном и том же возрасте развития растений и в одинаковых условиях выращивания в течение одного и того же периода времени. Кроме того, в линию должно быть включено достаточное количество растений, например, предпочтительно, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 6 или более. Сравнение можно выполнять в теплице, туннеле или в поле. См. также примеры конфигурации полевых тестов для сравнения развития цветков.

Если на растении, гомозиготном по мутантному аллелю, формируется несколько женских цветков, они, как правило, не оплодотворяются и не развиваются в плоды. Кроме того, если женские цветки все же формируются, они обычно формируются на более поздних этапах формирования растения, соответственно на более ранних этапах развития (например, в течение как минимум 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель после пересадки в поле) образуются только или преимущественно мужские цветки.

Другие фенотипы, возникающие, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, могут сводиться к тому, что лепестки мужских цветков сростаются или внешний вид мужских цветков отличается и/или форма листьев отличается от формы дикого типа. Таким образом, в одном аспекте предложены культивируемые растения арбуза, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля одного рецессивного гена, именуемого *CIHWS* при этом растения демонстрируют фенотипическое изменение (по сравнению с растением, гомозиготным по функциональному аллелю дикого типа), по меньшей мере, i) развиваются только мужские цветки или развивается больший процент мужских цветков, или развивается большее соотношение мужских и женских цветков, чем у растений гомозиготного дикого типа, и, кроме того, при необходимости, ii) мужские цветки часто, но не всегда, имеют сроставшиеся лепестки или мужские цветки имеют

другой внешний вид и/или iii) растение имеет листья другой формы (например, более широкие листья с выраженными долями).

Ген *Clhws* представляет собой эндогенный ген культивируемого арбуза, который при мутации и в гомозиготной форме приводит к образованию значительно более высокого процента мужских цветков (или исключительно мужских цветков), возможно, с изменением других характеристик, таких как форма листьев и/или внешний вид мужских цветков или мужские цветки, которые включают в себя сросшиеся лепестки.

Разделяющаяся популяция, полученная путем скрещивания мутантного растения арбуза, идентифицированного авторами изобретения, с элитной линией арбуза, позволила картировать ген на участке размером 0,27 Мб по направлению к одному концу хромосомы 5. Дальнейший анализ указанного участка привел к идентификации гена, содержащего мутацию, которая привела к преждевременному образованию СТОП-кодона, кодирующего аминокислоту 204 (W204), и усечению кодируемого белка.

Замена одного нуклеотида (гуанина на аденин) привела к мутации кодона TGG (кодирующего аминокислоту W или Trp или триптофан аминокислоты 204) на TAG (СТОП-кодон трансляции). Мутация была уникальной для линии и не выявлялась в 107 повторно линиях полногеномного секвенирования. Ген получил название *Clhws*. Для скрининга растений на наличие мутантного аллеля был разработан аллель-специфичный маркер, предусмотренный SEQ ID NO: 5. ОНП в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 5 (либо G для обнаружения кодона TGG, либо A для обнаружения кодона TAG, таким образом, можно использовать для различения аллеля дикого типа и мутантного аллеля (W204*), кодирующего усеченный белок. В случае с другими мутантами (например, теми, что указаны в Таблице А) можно без труда создать аналогичные аллель-специфичные маркеры. Кодон TGG, который был мутирован в TAG, выявлен в геномной последовательности SEQ ID NO: 4 на нуклеотидах 610 – 612 и в геномной последовательности SEQ ID NO: 8 на нуклеотидах 1797 – 1799. В геноме арбуза присутствует изменение нуклеотида 611 SEQ ID NO: 4 или нуклеотида 1798 SEQ ID NO: 8, соответственно, его можно выявить при помощи маркера ОНП и он кодирует мутантный белок *CLHWS*. В гомозиготной форме данная мутация дает описанный фенотип.

В мутантном растении арбуза кодон триптофана (W или Trp) в положении аминокислоты 204 белка дикого типа CLHWS (SEQ ID NO: 1) заменен СТОП-кодоном в мутантном белке, таким образом обеспечив преждевременную терминацию на аминокислоте 203 (SEQ ID NO:2), как показано на Фигуре 1. В кДНК мутантного аллеля нуклеотид 611 представляет собой аденин (A), в то время как в кДНК дикого типа он представляет собой гуанин (G) (SEQ ID NO:3). Такое изменение одного нуклеотида (или ОНП с G на \rightarrow A) приводит к изменению кодона с кодона TGG (кодирующего Trp или W) на TAG (стоп-кодон). Кроме того, кДНК и геномная ДНК оказались идентичными, поскольку отсутствовали интроны.

Было обнаружено, что указанное усечение белка CLHWS приводит к тому, что для белка характерна отсутствующая или сниженная функция *in vivo*. В результате растение, гомозиготное по этому мутантному белку (и, соответственно, лишенное функционального белка дикого типа), развивает комбинацию фенотипов, которые отличаются от дикого типа, особенно существенно увеличен процент мужских цветков (и выше соотношение мужских и женских цветков), у мужских цветков иногда наблюдаются сросшиеся лепестки и другая форма листьев. При изучении прогнозируемых свойств структуры белка дикого типа CLHWS белка в RaptorX (сеть Интернет, raptorx.uchicago.edu/StructurePropertyPred/predict/), можно увидеть, что аминокислоты W204 находятся в высококонсервативной, высокоструктурированной и свернутой области, состоящей из множества бета-складок (Фигура 5). Как видно, весь белок сложен в три отдельные структуры, причем аминокислоты 93 – 380 содержат несколько бета-складок, которые складываются в представленную трехмерную структуру. Усеченный белок, содержащий только аминокислоты 1 – 203, с высокой вероятностью приведет к отсутствию у белка функции *in vivo*. Таким образом, весьма вероятно, что такое же фенотипическое изменение будет наблюдаться, по меньшей мере, у любого другого мутанта, у которого белок дикого типа либо не экспрессируется, либо кодируемый белок у него нефункционален. Например, в Таблицах А или В указано, что мутант W229Stop также дает усеченный белок, а из примера 3 видно, что семена данного мутанта демонстрируют такую же аномальную (более широкую и рассеченную на доли) форму листьев, как и у мутанта W204Stop. Соответственно прогнозируется, что у растений, гомозиготных по мутантному аллелю W229Stop, будет развиваться более высокий процент мужских цветков.

Тем не менее, снижение экспрессии аллеля дикого типа или белков с пониженной функцией может привести к более высокому проценту развития мужских цветков. Специалист в данной области может без труда проверить это без излишних затруднений, создав мутантные аллели *Clhws* (например, путем мутагенеза, технологии TILLING или путем целевого редактирования генов), делая их гомозиготными в растении и анализируя фенотип. Специалист в данной области может, например, сосредоточить внимание на прогнозируемых мутантах, например, по результатам анализа с помощью ПО прогноза патогенности PROVEAN можно установить их «вредоносность» и проанализировать их фенотип *in vivo* в составе гомозиготных растений. См. Пример 3. Несмотря на то, что анализ патогенности PROVEAN является лишь инструментом для прогнозирования функции белка, он полезен для экономии ресурсов, поскольку начинается с анализа мутантных аллелей, которые с большей вероятностью окажут влияние наличие сниженной или отсутствующей функции белка *in vivo*.

Одним аспектом изобретения предусмотрено растение арбуза или часть растения, содержащая, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, именуемого *ClHWS*, отличающегося тем, что указанный мутантный аллель либо

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

б) 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) обеспечивает значительно больший процент мужских цветков (или фенотип i), развиваются только мужские цветки, или больший процент мужских цветков, или большее соотношение мужских и женских цветков, по сравнению с гомозиготным вариантом дикого типа, а также, при необходимости, ii) мужские цветки, часто, но не всегда, имеющие сросшиеся лепестки, или мужские цветки, имеющие другой внешний вид, и/или iii) растение, имеющее листья другой формы), в случаях, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, и отличается тем, что аллель арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или белок, который, по меньшей мере, на 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичен последовательности SEQ ID NO: 1.

Функциональный белок дикого типа ClHWS арбуза представлен в SEQ ID NO: 1. Тем не менее, в арбузах могут присутствовать некоторые вариации аминокислотной последовательности, а функциональные белки CLHWS белки 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, предусмотренной настоящей заявкой, или отличающиеся тем, что белок, по меньшей мере, на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,3%, 99,4%, 99,5% или 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% по своей последовательности идентичен белкам SEQ ID NO: 1 (при парном выравнивании, например, с использованием Emboss-Needle). Такие функциональные варианты белка ClHWS SEQ ID NO: 1 могут встречаться в других линиях или сортах арбуза. Таким образом, эти аллели могут различаться по последовательности, при этом фенотип растения аналогичен фенотипу дикого типа. Такие функциональные варианты аллелей (аллельные варианты) можно найти, например, путем секвенирования гена CLHWS многочисленных различных линий или сортов арбуза, которые имеют нормальный рисунок цветения, нормальную форму листьев и лепестков.

Таким образом, в одном аспекте функциональные варианты белка арбуза SEQ ID NO: 1 представляют собой белки, которые, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 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 парном выравнивании (с использованием, например, Needle с параметрами по умолчанию). В одном аспекте разновидность аминокислотной последовательности обнаруживается за пределами консервативного домена F-box. В одном аспекте функциональные белки, которые, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,3%, 99,4%, 99,5% или 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичности последовательности с белком SEQ ID NO: 1, соответственно содержат аминокислоты, которые на 100% идентичны SEQ ID NO: 1 в случае с доменом F-box, выделенным на Фигуре 1 жирным шрифтом.

Поскольку домен F-box высококонсервативен внутри вида, прогнозируется, что любая мутация (делеция, вставка и/или замена, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот) в домене приведет к возникновению мутантного белка ClHWS,

который имеет сниженную или отсутствующую функцию *in vivo*, тем самым приводя к появлению модифицированного фенотипа, описанного по тексту настоящей заявки, отличающегося тем, что мутантный аллель находится в гомозиготной форме, например, диплоидного растения.

Таким образом, вставка, делеция и/или замена одной или нескольких аминокислот в домене F-box будет отрицательно влиять на функцию белка.

Аналогичным образом, из-за сворачивания трехмерной структуры С-концевой области, начинающейся с аминокислоты 93 и заканчивающейся аминокислотой 380 SEQ ID NO: 1 (или эквивалентной области в белке, которая, по меньшей мере, на 90%, 93% 95 %, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1) и содержит большое количество бета-складок, вставка, делеция и/или замена одной или нескольких аминокислот в С-концевой области отрицательно повлияет на функцию белка. Соответственно, это также является аспектом настоящего изобретения. Следовательно, любая вставка, делеция или замена одной или нескольких аминокислот с 93 по 380 (или эквивалентной области в белке, который содержит, по меньшей мере, 90%, 93% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1), включая усечение или делецию всей или части области, по тексту настоящей заявки рассматривается как мутантный аллель *Clhws*, который придает модифицированный фенотип, описанный по тексту настоящей заявки.

Таким образом, одним аспектом предусмотрено растение или часть растения арбуза, содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, именуемого *Clhws*, отличающегося тем, что указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, делетированных или замененных в домене F-box белка, начиная с аминокислоты 45 и заканчивая аминокислотой 83 SEQ ID NO: 1 или аналогичных аминокислот в варианте белка *CLHWS*, который содержит, по меньшей мере, 90%, 93% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, или включает в себя одну или более аминокислот, вставленных, делетированных или замененных в С-концевой области, начиная с аминокислоты 93 и заканчивая аминокислотой 380 SEQ ID NO: 1, или аналогичных аминокислот в варианте белка *Clhws*, который содержит, по меньшей мере, 90%, 93% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и причем указанный мутантный аллель

обеспечивает i) формирование исключительно мужских цветков или больший процент мужских цветков или большее соотношение мужских и женских цветков, чем у гомозиготного дикого типа, и, кроме того, при необходимости, ii) мужских цветков, которые часто, но не всегда, имеют сросшиеся лепестки или другой внешний вид и/или iii) растений, имеющих листья другой формы), когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме.

Термины «начиная с» и «заканчивая чем-либо» или «от» и «до» включают в себя первую и последнюю указанные аминокислоты.

Таким образом, вставка, делеция и/или замена одной или нескольких аминокислот в домене F-box (начиная с аминокислоты 45 и заканчивая аминокислотой 83) и/или в C-концевой области, начиная с аминокислоты 93 и заканчивая аминокислотой 380, может представлять собой вставку, делецию и/или замену, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот. Сюда также относятся усечения белка дикого типа, отличающиеся тем, что отсутствуют, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 160, 170, 177, 200, 202, 210, 220, 250, 300, 350 или более аминокислот C-концевой области белка (или заменены другими аминокислотами, по сравнению с диким типом).

Еще одним аспектом предусмотрено растение или часть растения арбуза, содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, именуемого C1HWS, отличающегося тем, что указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, который включает в себя, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 177, 180, 190, 200, 202 или более аминокислот, вставленных, делетированных и/или замененных в последовательности SEQ ID NO: 1 или в его варианте белка C1HWS или белка, который содержит, по меньшей мере, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и отличается тем, что указанный мутантный аллель придает описанный модифицированный фенотип в случаях, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме. Мутантный белок C1HWS, соответственно, например, может быть усеченным в N-концевой или C-концевой области, при отсутствии указанных, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 160, 170, 177, 180, 190, 200, 202, 210, 220, 230, 250, 300, 350 или более аминокислот в N-концевой или C-концевой области либо любые другие, по меньшей мере, 10 аминокислот могут быть

делетированы, заменены или вставлены, по сравнению с функциональным белком дикого типа C1HWS.

Мутантные аллели можно создавать с помощью различных методов, таких как случайный мутагенез или целевое редактирование генов, а затем фенотип мутантного аллеля можно анализировать в растениях, гомозиготных по мутантному аллелю. Используя методы случайного мутагенеза или целевого мутагенеза, можно создать или реконструировать любую мутацию, например, мутанты, описанные в Таблице А, можно легко создать *de novo*. Праймеры TILLING могут, например, разрабатываться для конкретных мутаций в аллеле, что позволяет идентифицировать *de novo*, например, растения M2, содержащие мутанты из Таблицы А. Для реализации возможности раскрытия последовательности гена не требуется внесения семян. Аналогично, целенаправленное редактирование генов можно использовать для создания любой желаемой мутации в аллеле.

Любой мутантный аллель, который приводит к вставке, удалению и/или замещению одной или нескольких аминокислот функционального белка дикого типа, может привести к появлению мутантного белка со сниженной функцией или с отсутствием функции и, таким образом, может к появлению фенотипа, при котором i) развиваются только мужские цветки, или развивается больший процент мужских цветков, или развивается большее соотношение мужских к женским цветкам, чем у гомозиготного растения дикого типа, и дополнительно, при необходимости, ii) мужские цветки часто, но не всегда, имеют сросшиеся лепестки, или мужские цветки имеют другой внешний вид и/или iii) растение имеет листья различной формы, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме. Растения и части растений, содержащие такие мутантные аллели, являются одним из вариантов реализации настоящего изобретения.

«Эквивалентную аминокислоту» можно легко определить путем парного выравнивания аминокислотной последовательности, с использованием, например, Emboss Needle (параметры по умолчанию).

Мутация в кодоне может представлять собой вставку (по меньшей мере одного) нуклеотида, удаление или замещение в кодоне, которые приводят, например, к появлению другой рамки считывания или другого кодона, например, кодирующего другую аминокислоту или стоп-кодон. Также весь кодон может быть удален или

заменен другим кодоном (или, при необходимости, стоп-кодоном), что приводит либо к удалению кодируемой аминокислоты, либо к ее замене.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты с W204 с SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, например, W245 SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты с W229 с SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, например, W270 SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты с R64 с SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, например, R105 SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты S67 с SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, например, S108 SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты C69 с SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, например, C110 SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты номер V219 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, например, V260 с SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты номер G228 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, например, G269 SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты номер L242 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, например, L283 SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты номер E324 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, например, E365 SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты номер G340 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, например, G381 SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты номер S348 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, например, S389 SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотное замещение (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты номер A362 SEQ ID NO: 1 или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, например, A403 SEQ ID NO: 8.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует аминокислотную замену из таблицы А или В в SEQ ID NO: 1 или в аллеле, кодирующем белок CIHWS,

содержащий, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует мутантный белок *CIHWS*, содержащий укорочение, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 177, 180, 190, 200, 202, 210, 213, 215, 220, 230, 240, 250, 300, 310, 320, 330 аминокислот С-концевой области белка SEQ ID NO: 1 или С-концевой области белка, содержащего, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. В одном аспекте все аминокислоты, начинающиеся с (включительно) аминокислоты W204 SEQ ID NO: 1, или эквивалентной аминокислоты в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, удалены или заменены одной или более различными аминокислотами. В другом аспекте все аминокислоты, начинающиеся с (включительно) аминокислоты W229 SEQ ID NO: 1, или эквивалентной аминокислоты в белке, содержащем, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, удалены или заменены одной или более различными аминокислотами.

Как уже упоминалось, растение или часть растения арбуза может содержать мутантный аллель *CIhws*, причем мутантный аллель получается путем случайного мутагенеза или целевого мутагенеза, такого как методы, основанные на CRISPR. Случайный мутагенез может быть представлен, например, химически индуцированным (например, обработка EMS) или радиационно-индуцированным мутагенезом или другими методами, при которых мутации индуцируются случайным образом в геноме, а затем растения или части растений, содержащие мутации в эндогенном гене *CIHWS*, можно проверить и идентифицировать. Направленный мутагенез – это методы, при которых мутации специфически вводятся в целевой ген, такой как ген *CIHWS*, с использованием, например, *CrIspr-Cas9* или *CrIspr-CpfI* или другими известными способами.

В одном аспекте растение, содержащее мутантный аллель, не производится исключительно посредством чисто биологического процесса. Это означает, что мутантный аллель в какой-то момент был создан в результате вмешательства человека. Если такой созданный человеком мутантный аллель переносится от одного растения к другому путем скрещивания и селекции, то патент распространяется на

растения, содержащие мутантный аллель, даже если само растение было получено исключительно путем скрещивания и селекции.

В одном аспекте растение арбуза является диплоидным и содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *Clhws* согласно описанию выше, т.е. растение является гетерозиготным. Поскольку фенотип проявляется только тогда, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, эти растения имеют нормальное цветение и нормальные листья. Самоопыление таких гетерозиготных растений приведет к образованию гомозиготного растения, содержащего две копии мутантного аллеля. В другом аспекте растение арбуза является диплоидным и содержит две копии мутантного аллеля *Clhws* согласно описанию выше, т.е. растение является гомозиготным. Таким образом, растение также имеет модифицированный фенотип, как описано по тексту настоящего документа.

Растения и части растений, содержащие, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *Clhws*, предпочтительно являются культурными, а не дикими. Поэтому предпочтительно выращивать арбуз (*Citrullus lanatus*). Растение может представлять собой инбредную линию, гибрид F1 или линия скрещивания.

В одном аспекте растение представлено растением арбуза, и это растение арбуза является диплоидным, триплоидным или тетраплоидным, содержащим, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *Clhws*. 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 содержит две или четыре копии мутантного аллеля *Clhws*.

Сюда также включены семена, из которых можно вырастить растение или часть растения, как описано по тексту настоящего документа.

Растение и семена, из которых можно вырастить растение, особенно подходят в качестве опылителя для производства пыльцы, используемой для опыления других растений арбуза. Опылитель будет производить в основном мужские цветки, производящие пыльцу, или только такие цветки. Поскольку женские цветки отсутствуют, или их очень мало, растения не дают плодов (или дают очень мало плодов). Предпочтительно, его высаживают между растениями арбуза, плоды которых необходимо собирать, например, между диплоидными или триплоидными

растениями арбуза, женские цветки которых опыляются пыльцой растения-опылителя.

Для поддержания диплоидного растения-опылителя, используется растение, гомозиготное по мутантному аллелю *Clhws*, в одном аспекте, в качестве родителя мужского пола для опыления родителя женского пола, который является гетерозиготным по мутантному аллелю *Clhws*. Семена, полученные от женского родителя, будут гетерозиготными по мутантному аллелю или гомозиготными по мутантному аллелю в соотношении: 50% : 50%. Данный способ предусмотрен настоящей заявкой.

Способ скрещивания диплоидного мужского родителя, содержащего две копии мутантного аллеля *Clhws*, с женским родителем, содержащим одну копию мутантного аллеля *Clhws*, позволяющий развиваться плодам и собирать семена из указанных плодов. Способ дополнительно включает отбор тех семян или проростков, которые гомозиготны по мутантному аллелю *Clhws*.

Выбрать можно любой из следующих вариантов:

- a) проращивание семян для выращивания и селекции сеянцев, содержащих две копии мутантного аллеля *Clhws*, путем селекции сеянцев, содержащих модифицированную форму листьев и/или
- b) селекция семян или сеянцев на основе анализа ДНК или визуального анализа, или анализа веса и/или формы семян, содержащих две копии мутантного аллеля *Clhws*.

Анализ ДНК предпочтительно представляет собой неразрушающий (семена остаются жизнеспособными) анализ ДНК, такой как чипирование семян для получения ткани, содержащей геномную ДНК, а затем анализ присутствия мутантного аллеля в ДНК (например, с использованием анализов на основе ПЦР).

Визуальный анализ может, например, представлять собой анализ на основе компьютерного изображения, такой как описан компанией SeedX (на сайте seed-x.com) и в патентных заявках WO2019106638, WO2019106639 и WO2019106641.

Масса и/или форма семян также могут отличаться между гомозиготными и гетерозиготными по мутантному аллелю семенами.

Часть растения, содержащая, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *Clhws*, может представлять собой клетку, цветок, лист, стебель, черенок, семязачаток, пыльцу, корень, подвой, привой, плод, протопласт, зародыш, пыльник.

Кроме того, предложено вегетативно размножаемое растение, получаемое из части растения и содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *Clhws* в своем геноме.

В одном аспекте также предложен способ получения бессемянных плодов арбуза, причем указанный способ включает выращивание диплоидного растения арбуза, содержащего две копии мутантного аллеля *Clhws*, вблизи триплоидного растения арбуза, что позволяет опылять цветки триплоидного растения пыльцой диплоидного растения и, при необходимости, собирать бессемянные плоды, которые развиваются на триплоидном растении.

Когда речь идет о «выращивании вблизи», это означает, что диплоидные растения-опылители расположены достаточно близко к триплоидным растениям, чтобы позволить насекомым, которые могут посещать растения-опылители, переносить пыльцу с мужских цветков растения-опылителя на триплоидные растения. Опылитель можно сажать рядами, между рядами или случайным образом на том же поле, где высажены триплоидные растения. Кроме того, опылитель можно привить на тот же подвой, что и триплоидное растение, для получения растения с двойной прививкой. Такие растения с двойной прививкой затем можно выращивать рядом с триплоидными растениями, чтобы обеспечить эти растения пыльцой.

Предоставляется способ скрининга растений, частей растений или их ДНК на предмет наличия мутантного аллеля гена под названием *ClHWS* или отбора растения или части растения, содержащих мутантный аллель гена под названием *ClHWS*, или создания растения или части растения, содержащих мутантный аллель гена под названием *ClHWS*, отличающийся тем, что указанный мутантный аллель или

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

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

при этом аллель арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или белок, содержащий, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте мутантный аллель *Clhws* содержит мутацию в геномной ДНК, приводящую к экспрессии мутантного белка ClHWS, содержащего одну или более аминокислот, вставленных, удаленных или замененных согласно описанию выше, например, W204 с SEQ ID NO: 1 или W229 с SEQ ID NO: 1, (или эквивалентной аминокислоты в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1).

Однако при этом вариантами осуществления изобретения также являются различные мутантные аллели гена *ClHWS*, вызывающие развитие, по меньшей мере, более высокого процента мужских цветков в гомозиготной форме. Такие различные мутантные аллели *Clhws* могут быть созданы специалистом без особых сложностей. Специалист в данной области может, например, создать другие мутанты в гене ClHWS и определить, обеспечивают ли они в равной степени, по меньшей мере, более высокий процент мужских цветков в гомозиготной форме у диплоидного растения арбуза.

После идентификации нуклеотидной последовательности гена специалист в данной области может получить растения арбуза, содержащие мутанты в гене ClHWS, с помощью различных методов, например, мутагенеза, TILLING или CRISPR-Cas или других методов, известных в данной области. Специалист в данной области может осуществлять целевые мутации, особенно с помощью технологий целевой модификации генов, таких как Crispr-Cas, TALENS и других. Затем специалист в данной области может подтвердить фенотип растения, гомозиготного по мутантному аллелю *Clhws*, т.е. при развитии, по меньшей мере, более высокого процента мужских цветков. Следовательно, специалист в данной области не ограничен конкретными мутантами ClHWS, которые созданы изобретателями, и может в равной степени создавать другие мутации в аллеле *Clhws* арбуза и тем самым создавать другие мутанты, которые приводят, по меньшей мере, к более высокому проценту мужских цветков в гомозиготной форме. Для полученного фенотипа могут создаваться и тестироваться различные мутации, например, регуляторные элементы могут мутировать для уменьшения экспрессии (нокдаун) или устранения

экспрессии (нокаут) аллеля и, таким образом, уменьшения или устранения количества белка C1HWS дикого типа, присутствующего в клетке или растении. В качестве альтернативы, могут возникать мутации, которые приводят к снижению или утрате функции белка C1HWS, т.е. мутации (такие как миссенс-мутации или мутации сдвига рамки считывания), которые приводят к замене, вставке и/или удалению одной или нескольких аминокислот или при которых белок усекается за счет введения преждевременного стоп-кодона в кодирующую последовательность (нонсенс-мутации). Поскольку белок C1HWS содержит несколько консервативных доменов, в одном аспекте предполагается, что одна или несколько аминокислот заменены, удалены и/или вставлены в любой из этих доменов, поскольку такие мутации, вероятно, приведут к снижению функции белка или к ее потере. Затем можно проверить, приводит ли мутация к появлению ожидаемого фенотипа (или комбинации фенотипов), за счет создания растений, гомозиготных по мутации, выращивания линии растений рядом с линией растений дикого типа и анализа фенотипов обеих линий, например, процента мужских цветков, соотношения мужских цветков к женским, при необходимости, слияние лепестков или фенотипа мужского цветка и/или фенотипа формы листа.

В качестве альтернативы, специалист в данной области может реализовать способ получения культурного растения арбуза, способного давать более высокий процент мужских цветков, и/или способ получения растений арбуза, содержащих мутантные аллели *C1hws*, включающий следующие этапы:

а) введение мутаций в популяцию растений, частей растений или семян арбуза, особенно культурных растений; или предоставление популяции мутированных растений, предпочтительно популяции M2 или M3, или ее потомства;

б) селекция мутировавшего растения, обеспечивающего измененную форму листьев (например, более широколопастные, по сравнению с немутантной линией растений дикого типа) и/или множество мужских цветков (например, более высокий процент мужских цветков, чем у немутантной линии растений дикого типа, или более высокое соотношение мужских к женским цветкам) и/или мужские цветки со сросшимися лепестками или фенотипически отличающиеся мужские цветки (по сравнению с немутированной контрольной линией растений дикого типа);

с) при необходимости, определение наличия в растении, которое было отобрано в пункте б), мутантного аллеля гена *ClHWS*; и

д) при необходимости, выращивание растений, полученных согласно пункту с).

Этапы б) и с) также можно поменять местами, чтобы на этапе б) производился отбор растения, содержащего мутантный аллель гена *ClHWS*, а на этапе с) определялось, обеспечивает ли это растение (или его потомство) измененную форму листа и/или множество мужских цветков и/или мужские цветки со сросшимися лепестками или мужские цветки, имеющие другой фенотип/другой внешний вид.

Этап а) может осуществляться, например, путем мутагенизации семян одной или нескольких линий или сортов арбуза, например, путем обработки мутагенизирующими агентами, такими как химические мутагены, например, ЭМС (этилметансульфонат), или посредством облучения УФ-излучением, рентгеновскими лучами, гамма-лучами и тому подобное. Популяция может, например, представлять собой популяцию TILLING. Предпочтительно, чтобы перед проведением следующего этапа, то есть, б) или с), популяция мутагенизированных растений была подвергнута самоопылению, по меньшей мере, один раз (например, для получения поколения M2 или M3, M4 и т.д.).

Фенотипирование этапа б) можно легко провести визуально. Модифицированную форму листа легко определить, и в одном аспекте она является первым признаком присутствия эндогенного мутантного аллеля.

Такие растения или их потомство можно проверить на предмет наличия мутантного гена *Clhws* путем дальнейшего фенотипического анализа (например, позволив развиваться цветкам) и/или путем генотипирования растений на предмет мутаций в гене *ClHWS* и кодируемого белка или экспрессии гена *ClHWS*, с использованием секвенирования и других методов, известные специалистам в данной области. Таким образом, существуют различные методы или сочетания методов для проверки наличия мутантного аллеля гена *ClHWS* фенотипически выбранном растении.

Если этап б) представляет собой отбор растений, содержащих мутантный аллель гена *ClHWS*, то специалист в данной области также может использовать различные методы обнаружения ДНК, мРНК или белка гена *ClHWS*, чтобы

идентифицировать растение, содержащее мутантный аллель *Cihws*. Геномная ДНК гена *CIHWS* арбуза дикого типа, кодирующая функциональный белок CIHWS (SEQ ID NO: 1), представляет собой ДНК SEQ ID NO: 4, а кДНК (мРНК), кодирующая белок с SEQ ID NO: 1, приведена в SEQ ID NO: 3. Промотор находится выше этой последовательности и, например, может быть получен путем секвенирования или из базы данных генома арбуза. Например, по меньшей мере, 1000 или, по меньшей мере, 2000 оснований выше старта АТГ включают последовательность промотора.

В одном аспекте мутантный аллель гена *Cihws* представляет собой мутантный аллель, приводящий к снижению или отсутствию экспрессии гена *Cihws*, или мутантный аллель, приводящий к замене, вставке или удалению одной или нескольких аминокислот кодируемого белка Cihws, по сравнению с белком CIHWS дикого типа.

В одном аспекте мутантный аллель гена CIHWS можно получить путем индуцирования в ген (промотор или другие регуляторные элементы, сайты сплайсинга, кодирующую область и т.д.) как целевых, так и случайных мутаций и отбора растений, например, из потомства, включающего мутантный аллель *Cihws*. В одном аспекте выбран аллель, содержащий мутацию в кодоне, особенно в кодоне домена F-box или в С-концевой области (начиная с аминокислоты 93 и заканчивая аминокислотой 380 с SEQ ID NO: 1 или выбран эквивалентный участок в последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1), например, мутацию, которая вызывает замену, делецию, сдвиг рамки аминокислоты или появление стоп-кодона. В одном аспекте мутантный аллель вызывает укорочение кодируемого белка CIHWS арбуза.

В предпочтительном аспекте усечение происходит в С-концевой области и является достаточно длинным, чтобы привести к потере функции белка. Не ограничиваясь областью действия изобретения, существует мнение о том, что два усеченных белка, созданные согласно настоящему документу (W204STOP и W229STOP), лишены каких-либо функций *in vivo*, поскольку в них отсутствуют 202 и 177 аминокислоты в С-концевой области белка дикого типа, состоящего из 405 аминокислот. При этом не слишком сложно создать другие мутантные аллели, в которых также отсутствуют С-концевые аминокислоты (например, по меньшей мере, последние 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более С-концевых аминокислот,

включая, по меньшей мере, часть С-концевой области бета-структур, см. Фигуру 5), и также обеспечивают более высокий процент развития мужских цветков в гомозиготной форме. С-концевая область, образующая бета-структуры, простирается с аминокислоты 93 по 380 с SEQ ID NO: 1. Следовательно, в одном аспекте усечение приводит к отсутствию всех или части аминокислот с 93 по 380 с SEQ ID NO: 1 (или эквивалентной области в последовательности, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте маркер SNP аденин (A) в нуклеотиде 101 с SEQ ID NO: 5 (маркер mWM23348454) выявляется в геноме растения арбуза или его части, или в ДНК из него. Этот маркер SNP выявляет аллель, включающий мутацию W204STOP в SEQ ID NO: 1 в арбузе (или кодон W245STOP в SEQ ID NO: 8).

В одном аспекте маркер SNP аденин (A) в нуклеотиде 101 с SEQ ID NO: 5 (маркер mWM23348454), который соответствует аденину для нуклеотида 611 в SEQ ID NO: 3 и 4, и аденину для нуклеотида 1798 в SEQ ID NO: 8 обнаруживается в геноме растения арбуза или части растения, или в геномной ДНК или кДНК из него. Следовательно, в настоящем документе предлагается способ обнаружения присутствия аденина (мутанта) или гуанина (дикого типа) в нуклеотиде 611 с SEQ ID NO: 3 или 4 (или в последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичности с SEQ ID NO: 3 или 4) или в нуклеотиде 1798 SEQ ID NO: 8 (или в последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичности с SEQ ID NO: 8). Таким образом, геномную ДНК или кДНК арбуза можно проверить на наличие A (мутанта) или G (дикого типа) для нуклеотида 101 с SEQ ID NO: 5, и, при необходимости, может быть выбрано растение или часть растения, содержащая A.

Для других мутантных аллелей *Cihws*, таких как те, что приведены в Таблицах А и В, могут быть легко разработаны аналогичные маркеры SNP (или другие маркеры) и анализы генотипирования SNP (или другого генотипирования). Таким образом, в настоящем документе рассматриваются аллель-специфичные маркеры и способы обнаружения, особенно для любого мутантного аллеля, в результате которого происходит вставка, делеция или замена аминокислоты в домене F-box или в С-концевой области (начиная с аминокислоты 93 и заканчивая аминокислотой 93) белка CIHWS арбуза.

В частности, в одном аспекте генотип маркера mWM2334845 может определяться и использоваться для отбора растений или растений-потомков, содержащих аденин в нуклеотиде 101 с SEQ ID NO: 5 и, таким образом, содержащих мутантный аллель *Clhws*, в котором кодируемый белок ClHWS усечен и лишен всех аминокислот ниже (С-концевых) аминокислоты 203 с SEQ ID NO: 1 (или соответствующей аминокислоты последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичности с SEQ ID NO: 1).

Диплоидное растение, гетерозиготное по Clhws (т.е. Clhws/ClHWS), будет гетерозиготным по маркеру SNP, например, будет иметь генотип «AG» для нуклеотида 101 с SEQ ID NO: 5 (т.е. растение содержит одну хромосому, в которой имеется аденин «А» в нуклеотиде 101 с SEQ ID NO: 5 или в нуклеотиде 101 последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или более идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 5, и вторую хромосому, содержащую гуанин «G» в нуклеотиде 101 с SEQ ID NO: 5 или в нуклеотиде 101 последовательности, содержащей, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:5), тогда как растение, гомозиготное по *Clhws* (т.е. *Clhws/Clhws*), будет иметь генотип «AA» для нуклеотида 101 с SEQ ID NO: 5. (т.е. растение содержит две хромосомы, и они обе содержат аденин А в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 5 или в нуклеотиде 101 последовательности, содержащей, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO:5).

Маркер mWM23348454 был разработан на основе индуцированной мутации нуклеотида 611 (Гуанина) в геномной ДНК гена *ClHWS* дикого типа с SEQ ID NO: 4 на аденин (G611→A), в результате чего кодон TGG (кодирующий Trp или W) заменяется на кодон TAG, кодирующий стоп-кодон, что приводит к прекращению трансляции и усечению белка *ClHWS*. Таким образом, нуклеотид 611 геномной последовательности ClHWS с SEQ ID NO: 4 соответствует нуклеотиду 101 маркера mWM23348454 с SEQ ID NO: 5. Поскольку геномная ДНК и кДНК/мРНК идентичны, нуклеотид 611 последовательности кДНК/мРНК ClHWS с SEQ ID NO: 3 соответствует нуклеотиду 101 маркера mWM23348454 с SEQ ID NO: 5. Таким образом, этот маркер также можно использовать для скрининга кДНК/мРНК или геномной ДНК на наличие этой мутации. Нуклеотид 1798 геномной

последовательности C1HWS с SEQ ID NO: 8 также соответствует нуклеотиду 101 маркера mWM23348454 с SEQ ID NO: 5.

Специфичные для мутантного аллеля маркеры и маркерные анализы могут одинаково легко разрабатываться для любого мутантного аллеля *Clhws*, поскольку лежащее в основе геномное изменение, например, в кодоне, может использоваться для разработки маркерного анализа с целью обнаружения геномного изменения, например, лежащего в основе аминокислоты, которое раскрыто в настоящем изобретении, или других геномных изменений в мутантном аллеле *Clhws*, по сравнению с аллелем C1HWS дикого типа.

С использованием таких аллель-специфичных маркеров, которые выявляют специфические мутантные аллели *Clhws*, генотипирование может проводиться для обнаружения присутствия и количества копий аллеля в растениях и растительном материале (или полученной из них ДНК). Так, у диплоидов маркерный генотип вышеуказанного мутантного аллеля *Clhws* (лежащий в основе изменения W 204STOP белка в арбузе) представляет собой «AA», когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме. В триплоидах или тетраплоидах маркерный генотип можно использовать для определения количества копий мутантного аллеля. Таким образом, генотип может быть, например, AAA, если в триплоиде присутствуют три копии, или AAAA, если в тетраплоиде присутствуют четыре копии, или AAG, если в триплоиде присутствуют две копии, и т.д.

РАСТЕНИЯ, СЕМЕНА И ЧАСТИ РАСТЕНИЙ

В одном варианте реализации изобретения предложено культивируемое растение или семя арбуза или его часть (такая как клетка, ткань, орган, плод и т.д.), содержащая, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена под названием C1HWS, причем указанный мутантный аллель, обеспечивает, по меньшей мере, значительно более высокий процент мужских цветков, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

В одном аспекте мутантный аллель представляет собой мутантный аллель гена арбуза, который кодирует белок C1HWS с SEQ ID NO: 1 или белок, содержащий, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 (функциональный белок дикого типа), за счет чего мутантный аллель имеет пониженную экспрессию или экспрессия

в нем отсутствует, или же мутантный аллель кодирует мутантный белок C1HWS, содержащий одну или более аминокислот, замененных, вставленных и/или удаленных, по сравнению с белком дикого типа.

В одном из вариантов реализации одна или несколько замен, вставок или делеций аминокислот включают или состоят из замены, вставки или делеции одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких консервативных доменах F-бокс и/или в С-концевой области (аминокислоты с 93 по 380). Мутантный белок имеет пониженную функцию или утрачивает функции, по сравнению с белком дикого типа (и, таким образом, по сравнению с растением дикого типа, содержащим ген C1HWS дикого типа), предпочтительно растение, содержащее мутантный аллель в гомозиготной форме, продуцирует модифицированный фенотип, как описано по тексту настоящего документа.

При упоминании в настоящем документе конкретного положения нуклеотида или аминокислоты, например, аминокислоты 204 с SEQ ID NO: 1, «или аминокислоты 204 последовательности, содержащей, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO», это означает, что нуклеотид или аминокислота присутствует в вариантной последовательности по нуклеотиду или аминокислоте, соответствующей тому же нуклеотиду или аминокислоте (например, соответствующей аминокислоте 204 с SEQ ID NO: 1) в вариантной последовательности, т.е. в последовательности, содержащей, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97 %, 98% или 99% идентичности последовательности с упомянутой SEQ ID NO. Например, может получиться так, что вариантная последовательность короче на один или несколько нуклеотидов или аминокислот, но при попарном выравнивании вариантной последовательности с упомянутой SEQ ID NO можно увидеть, какой нуклеотид или аминокислота вариантной последовательности соответствуют тому же нуклеотиду или аминокислоте.

Мутантный аллель представляет собой мутацию в эндогенном гене культурного растения арбуза. Существование гена, придающего модифицированный фенотип, как описано по тексту настоящего документа, позволяет специалисту создать в этом гене другие мутанты *de novo*, например, в любой культивируемой линии или сорте.

Специалист в данной области может без особых сложностей получить растения согласно изобретению, например, путем реализации способа получения и/или идентификации мутантов C1HWS в мутантной популяции или путем целевого редактирования гена C1HWS.

Как уже упоминалось ранее, поскольку было выявлено, что ген C1HWS является геном, который кодирует белок с SEQ ID NO: 1 (белок арбуза дикого типа) в нормальных растениях арбуза, то могут быть созданы такие же или другие мутанты, отличные от тех, что были созданы изобретателями *de novo*.

Поскольку в функциональных белках C1HWS дикого типа могут существовать природные вариации, белок C1HWS дикого типа не обязательно должен быть на 100% идентичен белку с SEQ ID NO: 1, а может иметь меньшую идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, например, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 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. При этом в одном аспекте консервативный домен F-box, и/или N-концевая область, и/или C-концевая область на 100% идентичны домену с SEQ ID NO: 1, в результате чего вариация, по меньшей мере, на 90% идентичности находится за пределами одного или нескольких или же всех консервативных доменов или областей.

Как уже упоминалось ранее, мутантный аллель гена, кодирующего белок C1HWS, заставляет растение производить, по меньшей мере, высокий процент мужских цветков, а также, при необходимости, также сросшиеся лепестки или мужские цветки, имеющие другой внешний вид и/или измененную форму листьев, если растение является гомозиготным по мутантному аллелю, особенно если это 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 реализации изобретения, мутация в мутантном аллеле гена, кодирующего белок C1HWS, может быть представлена любой мутацией, включая делеции, усечения, вставки, точечные мутации, нонсенс-мутации, миссенс- или несинонимичные мутации, мутации сайта сплайсинга, мутации сдвига рамки считывания и/или мутации в регуляторных последовательностях. В одном аспекте мутация мутантного аллеля гена, кодирующего белок C1HWS, представляет собой точечную мутацию. Мутация

может происходить в последовательности ДНК, содержащей кодирующую последовательность гена, который кодирует белок С1НWS, или в последовательности РНК, кодирующей белок С1НWS, или же она может происходить в аминокислоте белка С1НWS. Что касается последовательности ДНК гена, кодирующего белок С1hws, мутация может возникать в кодирующей последовательности или в некодирующих последовательностях, таких как 5'- и 3'-нетранслируемые области, промоторы, энхансеры и т.д. кодирующего белок С1НWS гена. Что касается РНК, кодирующей белок С1НWS, мутация может происходить в пре-мРНК или мРНК. В одном аспекте мутантный аллель приводит к потере или снижению функции белка из-за замены, вставки и/или делеции одной или нескольких аминокислот, например, к замене, вставке одной или нескольких аминокислот и/или к удалению в С-концевой области белка или в одном или нескольких консервативных доменах белка. Например, усечение белка, вызывающее делецию, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 150, 170, 177, 200, 202 или более аминокислот С-концевой области белка дикого типа, приведет к образованию мутантного белка, который приводит к образованию модифицированного фенотипа, по сравнению с растением дикого типа, как было показано на примере мутантного белка W204STOP.

Аналогичным образом, мутации, при которых любой из консервативных доменов или высокоструктурированных областей (таких как С-концевая область, содержащая бета-структуры) полностью или частично удаляются или заменяются одной или более разными аминокислотами, приведут к потере функции белка или к ее снижению.

Например, мутация стоп-кодона, такая как в N-концевой области, предшествующей консервативному домену F-box, или в домене F-box, приводит к получению усеченного белка, имеющего пониженную функцию или утратившему функцию.

Аналогичным образом, вставки, делеции или замены аминокислот в N-концевой области, предшествующей С-концевой области, или в С-концевой области могут привести к снижению функции белка или к ее потере.

Любой мутантный аллель можно проанализировать на фенотип, когда аллель находится в гомозиготной форме, например, в диплоидных растениях, чтобы

оценить, действительно ли растение содержит изменения, например, в цветении, морфологии цветка и/или морфологии листьев согласно представленному описанию.

Таким образом, один из вариантов осуществления изобретения касается растительных клеток или растений по изобретению, содержащих мутантный аллель гена, кодирующего белок *СНWS*, и характеризующегося тем, что мутантный аллель содержит или оказывает влияние на одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из следующего:

а) делеция, усечение, вставка, точечная мутация, нонсенс-мутация, миссенс- или несинонимичная мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация сдвига рамки считывания в геномной последовательности;

б) мутация в одной или нескольких регуляторных последовательностях;

с) делеция, усечение, вставка, точечная мутацию, нонсенс-мутация, миссенс- или несинонимическая мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация сдвига рамки считывания в кодирующей последовательности;

д) делеция, усечение, вставка, точечная мутацию, нонсенс-мутация, миссенс- или несинонимическая мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация сдвига рамки считывания в пре-мРНК или мРНК; и/или

е) делеция, усечение, вставка или замена одной или нескольких аминокислот в белке *СНWS*.

В одном из аспектов мутантный аллель приводит к снижению или отсутствию экспрессии гена *СНWS*, или мутантный аллель кодирует белок, имеющий пониженную функцию или утративший функцию.

Снижение экспрессии или ее отсутствие означает, что существует мутация в регуляторной области гена *СНWS*, такой как промотор, в результате которой снижается или отсутствует транскрипт мРНК аллеля *СНWS*, по сравнению с растениями и частями растений, содержащими аллель *СНWS* дикого типа. Снижение экспрессии можно, например, определить путем измерения количества транскриптов мРНК, кодирующих белок *СНWS*, например, с помощью Нозерн-блоттинга или ПЦР с обратной транскрипцией. В настоящем документе под снижением предпочтительно понимается уменьшение количества транскриптов РНК, по меньшей мере, на 50%, в частности, по меньшей мере, на 70%, при

необходимости, по меньшей мере, на 85% или, по меньшей мере, на 95% или даже на 100% (отсутствие экспрессии), по сравнению с растением или частью растения, содержащими ген C1HWS дикого типа. Экспрессию можно анализировать, например, в ткани цветка или листа.

В одном из аспектов белок, содержащий одну или более аминокислот, заменен, вставлен или удален, по сравнению с белком дикого типа. Таким образом, в арбузе одна или несколько аминокислот вставлены, удалены или заменены, по сравнению с белком C1HWS дикого типа с SEQ ID NO: 1 или белком C1HWS дикого типа, содержащим, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1; при этом мутантный белок имеет пониженную функцию или утрачивает функцию, по сравнению с белком дикого типа, и в результате этого получается, что i) развиваются только мужские цветки, или развивается больший процент мужских цветков, или развивается большее соотношение мужских к женским цветкам, чем в гомозиготном диком типе тип растения, и дополнительно при необходимости, ii) мужские цветки часто, но не всегда, имеют сросшиеся лепестки или другой внешний вид, и/или iii) растение имеет листья другой формы, когда мутантный аллель присутствует в гомозиготной форме в диплоидном растении.

В одном из аспектов C1HWS дикого типа содержит консервативный домен F-box. Таким образом, в одном аспекте мутантный аллель представляет собой мутантный аллель гена C1HWS, причем этот ген кодирует белок дикого типа с SEQ ID NO: 1 (арбуз) или белок дикого типа, содержащим, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и при этом белок дикого типа содержит консервативный домен F-box аминокислот с 45 по 83 с SEQ ID NO: 1.

В одном из аспектов белок C1HWS дикого типа содержит С-концевую область. Таким образом, в одном аспекте мутантный аллель представляет собой мутантный аллель гена C1HWS, причем этот ген кодирует белок дикого типа с SEQ ID NO: 1 (арбуз) или белок дикого типа, содержащим, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, при этом белок дикого типа содержит С-концевую область аминокислот с 93 по 380 с SEQ ID NO: 1.

В одном из аспектов белок ClHWS дикого типа содержит С-концевую область. Таким образом, в одном аспекте мутантный аллель представляет собой мутантный аллель гена ClHWS, причем этот ген кодирует белок дикого типа с SEQ ID NO: 1 (арбуз) или белок дикого типа, содержащим, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и при этом белок дикого типа содержит N-концевую область аминокислот с 1 по 44 с SEQ ID NO: 1.

В одном из аспектов белок ClHWS дикого типа содержит консервативный домен F-box и С-концевую область, т.е. любая вариация функционального белка дикого типа находится за пределами этого консервативного домена или области.

В еще одном аспекте белок ClHWS дикого типа содержит консервативный домен F-box, С-концевую область и N-концевую область, т.е. любая вариация функционального белка дикого типа находится за пределами этих консервативных доменов или областей.

Мутантные аллели вышеуказанных аллелей дикого типа в одном из аспектов представляют собой мутантные аллели, имеющие пониженную экспрессию или не имеющие экспрессии (например, за счет мутаций в промоторных или энхансерных элементах) или продуцирующие мутантный белок, который содержит одну или более аминокислот, вставленных, удаленных или замененных по сравнению с белком дикого типа, при этом мутантный белок имеет пониженную функцию или не имеет функции *in vivo*, что можно определить, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме в растении, и путем анализа фенотипа (или комбинации фенотипов) гомозиготного растения для мутантного аллеля, по сравнению с растением, гомозиготным по аллелю дикого типа. Такой же фенотипический анализ можно провести для мутантного аллеля с пониженной экспрессией гена или без такой экспрессии. Таким образом, любой мутантный аллель можно сделать в растении гомозиготным, а фенотип можно сравнить с контрольным растением, содержащим исходный немутантный аллель.

Таким образом, в одном из аспектов предложен мутантный аллель *Clhws*, кодирующий мутантный белок, в котором аминокислота W204 или W229 с SEQ ID NO: 1 (или последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичная SEQ ID NO:

1), заменена другой аминокислотой или удалена, например, кодон заменяется стоп-кодоном.

При упоминании в настоящем документе группы аминокислот от одной до другой аминокислоты, этот диапазон включает в себя упомянутую начальную/первую и конечную/последнюю аминокислоту.

Когда речь идет об «удаленной» аминокислоте, сюда включается мутация, при которой кодон заменяется на стоп-кодон, или кодон удаляется, или мутация, при которой происходит сдвиг рамки считывания, в результате чего аминокислота не кодируется. Аналогичным образом, когда речь идет о «замененной» аминокислоте, сюда включается мутация, при которой кодон кодирует другую аминокислоту или вставляется, 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 *Clhws*, могут быть представлены растениями семейства Cucurbitaceae, особенно культивируемыми видами, такими как арбуз (*Citrullus lanatus*). Кроме того, сюда включены растения и части растений семейства Cucurbitaceae, особенно арбуз, содержащие две копии мутантного аллеля *Clhws*.

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

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

Растения арбуза и их части, которые содержат, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *Clhws*, могут быть диплоидными, тетраплоидными или триплоидными. В еще одном аспекте это может быть другой полиплоид, например, пентаплоид, гексаплоид, гептаплоид, октаплоид и др. Тетраплоидное растение, содержащее четыре копии *Clhws*, можно, например, использовать для получения октаплоида за счет удвоения хромосом. Скрещивание такого октаплоида с диплоидом, гомозиготным по *Clhws*, приведет к образованию пентаплоида, содержащего пять копий *Clhws*. В одном из аспектов полиплоидное растение арбуза

содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *Clhws*, но при этом оно также может содержать больше копий, например, в предпочтительном аспекте триплоидное растение содержит две или три копии мутантного аллеля *Clhws*, или тетраплоидное содержит четыре копии мутантного аллеля *Clhws*.

Таким образом, диплоидное растение может иметь генотип *Clhws/CIHWS* (гетерозиготный по мутантному аллелю) или *Clhws/Clhws* (гомозиготный по мутантному аллелю). В одном из аспектов диплоидное растение, содержащее аллель *Clhws* в гомозиготной форме, представляет собой двойное гаплоидное растение (ДГ), например, двойной гаплоидный арбуз, растение или растительную клетку или часть растения.

Триплоидное растение арбуза может иметь генотип *Clhws/CIHWS/CIHWS* или *Clhws Clhws/CIHWS* или *Clhws/Clhws/Clhws*. Триплоидное растение с генотипом *Clhws/CIHWS/CIHWS* можно получить путем скрещивания женского тетраплоида дикого типа (*CIHWS/CIHWS/CIHWS/CIHWS*) с диплоидным мужским растением, которое является гомозиготным по мутантному аллелю (*Clhws/Clhws*). Триплоидное растение с генотипом *Clhws/Clhws/CIHWS* можно получить путем скрещивания женского тетраплоида (*Clhws/Clhws/Clhws/Clhws*) с диплоидным мужским растением, которое является гомозиготным по аллелю дикого типа (*CIHWS/CIHWS*).

Тетраплоидное растение арбуза может иметь генотип *Clhws/CIHWS/CIHWS/CIHWS* или *Clhws/Clhws/CIHWS/CIHWS* или *Clhws/Clhws/Clhws/CIHWS* или *Clhws/Clhws/Clhws /Clhws*. Генотипы *Clhws/Clhws/CIHWS/CIHWS* можно получить путем удвоения хромосом диплоидного *Clhws /CIHWS*. Генотипы *Clhws /Clhws/Clhws/Clhws* можно получить путем удвоения хромосом диплоидного *Clhws/Clhws*. Два других генотипа *Clhws/CIHWS/ CIHWS/CIHWS* и *Clhws/Clhws/Clhws/CIHWS* можно, например, получить путем скрещивания двух тетраплоидов генотипа *Clhws/Clhws/CIHWS/CIHWS* и выявления генотипов в потомстве.

В одном из аспектов растение арбуза является гомозиготным по *Clhws*, в другом аспекте оно является гетерозиготным по *Clhws*. В одном аспекте это инбредная линия или сорт. В дополнительном аспекте это гибрид F1.

Семена, из которых можно вырастить любое из описанных растений арбуза (содержащие, по меньшей мере, один мутантный аллель *Clhws*), а также части такого

растения, такие как цветы, клетки, корни, плоды, подвои, отростки, листья, стебли, результаты вегетативного размножения, черенки, а также культуры клеток или тканей *in vitro*, пыльца, микроспоры, завязи и т.д.

ДИПЛОИДНЫЕ РАСТЕНИЯ АРБУЗА, СОДЕРЖАЩИЕ МУТАНТНЫЙ АЛЛЕЛЬ *Clhws*

В одном из аспектов растение арбуза представляет собой диплоидную линию (например, инбредную линию) или сорт, содержащий, по меньшей мере, одну мутантную копию *Clhws*, предпочтительно две мутантные копии (т.е. является гомозиготным по *Clhws*). В одном аспекте диплоидное растение, которое является гомозиготным по *Clhws*, будет обеспечивать фенотип, при котором: i) развиваются только мужские цветки или развивается больший процент мужских цветков, или развивается большее соотношение мужских к женским цветкам, чем у гомозиготного растения дикого типа, и, при необходимости, дополнительно ii) мужские цветки часто, но не всегда, имеют сросшиеся лепестки или другой внешний вид, и/или iii) растение имеет листья разной формы.

В конкретном мутантном аллеле (W204*), который определен в настоящем документе, все эти три фенотипа наблюдались вместе, но также возможно, что другие мутанты в аллеле *Clhws* могут и не демонстрировать комбинацию всех трех фенотипов, например, слияние лепестков может отсутствовать или быть менее частым, или форма листа может не так явно отличаться от листьев дикого типа, по сравнению с листьями, которые показаны на Фигуре 3 (фото слева). Такие мутанты, которые различаются по своему фенотипу в части сросшихся лепестков или внешнего вида мужских цветков и/или формы листьев, включены в настоящий документ, при условии, что они содержат повышенный процент образовавшихся мужских цветков, по сравнению с растением дикого типа. Таким образом, влияние мутантного аллеля на увеличение процента мужских цветков или увеличение соотношения мужских к женским цветкам, по сравнению с процентом и соотношением, наблюдаемым у растений, которые являются гомозиготными по функциональному аллелю дикого типа, является наиболее важным эффектом при использовании таких растений в качестве опылителей. Следовательно, любые такие мутантные аллели, которые обеспечивают образование фенотипа, i) включенного в настоящий документ, а также фенотипов ii) и/или iii), присутствующих при необходимости, или в несколько иных процентных соотношениях.

Более того, хотя мутантный аллель *Clhws*, который включает мутацию W204*, обеспечивает образование фенотипов i), ii) и iii) на исходном генетическом фоне, на котором он был создан, экспрессия фенотипов ii) и iii) при разном генетическом фоне несколько отличалась (см. Пример 2).

Таким образом, в одном из аспектов диплоидное растение арбуза содержит одну или две копии мутантного аллеля *Clhws*, причем этот аллель (в гомозиготной форме) придает, по меньшей мере, фенотип, описанный в пункте i), а именно: развиваются только мужские цветки или больший процент мужских цветков, или большее соотношение мужских к женским цветкам, по сравнению с контрольным растением, которое является гомозиготным по функциональному аллелю *ClHWS* дикого типа. При необходимости, описанные в пунктах ii) и/или iii) фенотипы также могут передаваться мутантным аллелем.

В настоящий документ также включены семена диплоидного растения, содержащего одну или две копии мутантного аллеля *Clhws*, а также части такого растения, такие как цветы, листья, стебли, результаты вегетативные размножения, клетки, черенки, плоды, культуры клеток или тканей *in vitro*, а также пыльца, микроспоры, пыльники, завязи, подвои, привои и т.д. Таким образом, в одном из вариантов реализации диплоидное растение или семена, из которых можно вырастить растение, или ткань, или части растения (пыльца, пыльники, микроспоры) содержат мутантный аллель *Clhws*, как описано по тексту настоящего документа.

В одном из аспектов диплоидное растение (или часть растения, или семя) содержит одну копию мутантного аллеля *Clhws*, который кодирует укороченный белок, например, мутантный белок с SEQ ID NO: 2, содержащий только аминокислоты с 1 по 203 белка дикого типа, и лишенный остальных аминокислот, или же мутантный белок, содержащий только аминокислоты с 1 по 228 белка дикого типа и лишенный остальных аминокислот.

В одном из аспектов диплоидное растение (или часть растения, или семя) содержит две копии мутантного аллеля *Clhws*, который кодирует укороченный белок, например, мутантный белок с SEQ ID NO: 2, содержащий только аминокислоты с 1 по 203 белка дикого типа, и лишенный остальных аминокислот, или же мутантный белок, содержащий только аминокислоты с 1 по 228 белка дикого типа и лишенный остальных аминокислот.

В одном из аспектов предусмотрено диплоидное растение (или часть растения или семя), которое содержит одну или две копии мутантного аллеля *Clhws*, отличающаяся тем, что в геномной ДНК нуклеотид 611 с SEQ ID NO: 4 представляет собой аденин, или в геномной ДНК нуклеотид 1798 с SEQ ID NO: 8 представляет собой аденин.

В одном из аспектов предусмотрено диплоидное растение (или часть растения или семя), которое содержит одну или две копии мутантного аллеля *Clhws*, отличающаяся тем, что в геномной ДНК нуклеотид 687 с SEQ ID NO: 4 представляет собой аденин, или в геномной ДНК нуклеотид 1874 с SEQ ID NO: 8 представляет собой аденин.

В одном из аспектов диплоидное растение (или часть растения, или семя) содержит одну или две копии мутантного аллеля *Clhws* согласно описанию в Таблицах А и В.

В одном аспекте диплоидное растение (или часть растения, или семя) содержит любой другой мутантный аллель *Clhws*, как описано по тексту настоящего документа, что приводит к образованию гомозиготной формы с модифицированным фенотипом согласно описанию.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ ОПЫЛИТЕЛЯ

Диплоидные растения, содержащие мутантный аллель *Clhws* в гомозиготной форме, в одном из аспектов используются в качестве опылителя для получения пыльцы для других растений арбуза, таких как диплоидные или триплоидные растения арбуза.

Таким образом, для диплоидных растений арбуза, содержащих две копии мутантного аллеля *Clhws*, предусмотрен способ получения семенных (опыление других диплоидных растений) или бессемянных (опыление триплоидных растений) плодов. Таким образом, в одном аспекте предусмотрен способ выращивания диплоидных растений арбуза для получения пыльцы, включающий стадии: посева или посадки диплоидных растений арбуза, содержащих две копии мутантного аллеля *Clhws* в своем геноме, предпочтительно вблизи диплоидных или триплоидных растений арбуза, содержащих копии гена *ClHWS* дикого типа, а также сбора плодов арбуза с семенами или без семян, которые развиваются на этих растениях.

Когда растение, содержащее мутантный аллель *Clhw₅v* гомозиготной форме, используется для получения пыльцы для опыления цветков диплоидных растений, лишенных мутантного аллеля, пыльца будет содержать одну копию мутантного аллеля, а семена, развивающиеся в плодах, соответственно будут также содержать одну копию мутантного аллеля. Таким образом, такие плоды и семена включены в настоящий документ.

Когда растение, содержащее мутантный аллель *Clhw₅v* гомозиготной форме, используется для получения пыльцы для опыления цветков триплоидных растений, то пыльца только индуцирует завязывание плодов, а развивающиеся плоды получают бессемянными.

Предусмотрен способ получения бессемянных плодов на триплоидных гибридных растениях арбуза, включающий:

(а) предоставление диплоидного растения арбуза, содержащего две копии мутантного аллеля *Clhw₅v*, и триплоидного растения арбуза,

(b) обеспечение опыления цветков триплоидного растения пыльцой диплоидного растения или опыления цветков триплоидного растения пыльцой диплоидного растения, и, при необходимости,

(с) сбор (бессемянных) плодов, выращенных на триплоидном растении.

Этап а) может включать выращивание диплоидного растения арбуза рядом или вблизи триплоидного растения или же сбор цветков или пыльцы диплоидного растения и опыление цветков триплоидного растения на этапе b).

Этот способ можно применять в полевых условиях или в контролируемых средах, таких как туннели или теплицы.

Таким образом цветы и/или пыльца, или тычинки растений-опылителей в одном аспекте могут собираться, например, вручную, и, при необходимости, сохраняться до тех пор, пока они не потребуются для опыления.

В полевых условиях способ может включать посев или пересадку диплоидного опылителя и триплоидных растений в поле.

Для этого существуют различные методы, например, растения-опылители можно сажать отдельными рядами от триплоидных растений (например, за 1 рядом растений-опылителей следуют, например, 2-4 ряда триплоидных растений, т.е. в

соотношениях 1:2, 1:3, 1:4), или можно высаживать внутри рядов триплоидных растений или между такими рядами (но не в отдельных рядах опылителей). Триплоидные растения обычно сажают на горках в ряд, и одна из стратегий заключается в том, чтобы высадить опылитель, например, на каждой третьей или четвертой горке, при этом на остальных горках высаживаются триплоидные растения. Другая стратегия заключается в том, чтобы высаживать опылитель не на горках, а между ними.

Жизнеспособную пыльцу пчелы переносят с мужских цветков опылителя на женские (плодоносящие) цветки триплоидного арбуза. Размещение опылителя в ряду с триплоидными растениями, а не в отдельных рядах, может быть плюсом, поскольку медоносные пчелы часто работают по ряду, а не поперек.

Таким образом, в целом на поле для выращивания триплоидов описанное в настоящем документе растение-опылитель (содержащее два мутантных *Cllws* аллели) можно высаживать через равные промежутки в одном и том же ряду (например, 1, 2, 3 или 4 последовательных триплоидных растения, за которыми следует одно растение-опылитель и т. д.), или ряды триплоидных гибридов и растений-опылителей могут чередоваться через определенные промежутки (например, 1, 2, 3 или 4 ряда триплоидов, за которыми следует один ряд растений-опылителей). В качестве альтернативы триплоиды сажают рядами, а растения-опылители – через равные промежутки между рядами.

Таким образом, на поле могут быть высажены триплоидные гибридные саженцы арбуза и сеянец-опылитель согласно изобретению в соотношении 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В одном варианте каждое из 5, 4, 3, 2 или 1 последовательных растений представляет собой триплоидный гибридный сеянец арбуза, за которым следует, по меньшей мере, один сеянец-опылитель согласно изобретению. При необходимости, за каждым из последовательных триплоидных гибридных растений можно также получить 1, 2 или 3 сеянца-опылителя согласно изобретению.

В еще одном варианте осуществления поле содержит ряды только триплоидных гибридов и ряды только сеянцев-опылителей, отличающиеся тем, что соотношение рядов триплоидных растений к рядам опылителей составляет 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или, при необходимости, 1:1.

Оптимальные расстояния между растениями и между рядами могут сильно отличаться в зависимости от местоположения, условий выращивания и т.д. Таким образом, расстояния между растениями могут быть любыми, например, около 3 футов (около 90 см), около 4 футов (около 120 см), около 5 футов (около 150 см) или около 6 футов (около 180 см) или более.

Можно использовать любой триплоидный гибрид, например, известные сорта триплоидных гибридов.

Триплоидные гибриды и/или растения-опылители можно прививать на другой подвой, поскольку часто подвои используются для повышения устойчивости растений к стрессу и/или болезням. Такие привитые растения, особенно растение, содержащее привой, который представляет собой диплоидное растение-опылитель, содержащее два мутантных аллеля гена *Clhws*, и другой подвой, включены в область действия настоящего документа.

Соответственно, предусмотрен способ, включающий посев или выращивание диплоидных растений арбуза, содержащих две копии мутантного аллеля *Clhws*, в зоне выращивания, такой как поле, теплица или туннель, рядом или поблизости с диплоидными или триплоидными растениями арбуза, и обеспечивающий опыление цветков диплоидных или триплоидных растений арбуза и, при необходимости, сбор плодов.

В конкретном аспекте диплоидное растение-опылитель (содержащее две копии мутантного аллеля *Clhws*, как описано по тексту настоящего документа) дополнительно является гомозиготным по мутантному аллелю множественного разветвления, при этом растение-опылитель имеет многоразветвленный тип роста и, как показано в примерах, обеспечивает большое количество мужских цветков в течение длительного периода.

В одном аспекте растение, содержащее, по меньшей мере, одну, но предпочтительно две копии мутантного аллеля *Clhws*, соответственно, дополнительно содержит, по меньшей мере, одну, но предпочтительно две копии мутантного аллеля множественного разветвления. Это может быть любой мутантный аллель множественного разветвления, но в одном аспекте мутантный аллель множественного разветвления кодирует белок с SEQ ID NO: 9. Таким образом, в одном из аспектов мутантный аллель множественного разветвления

содержит геномную ДНК с SEQ ID NO: 10 или последовательность, которая в значительной степени идентична последовательности с SEQ ID NO: 10 и которая из-за вырожденности генетического кода также кодирует белок с SEQ ID NO: 9. Однако при этом мутантный аллель множественного разветвления может также представлять собой другой мутантный аллель в локусе, если мутантный аллель обеспечивает многоразветвленный тип роста в гомозиготной форме.

С помощью этого опылителя для оптимального опыления можно, например, посадить одно растение-опылитель между каждым третьим, каждым четвертым или каждым пятым триплоидным (или диплоидным) растением арбуза.

Растения арбуза, которые являются гетерозиготными по мутантному аллелю *Clhws* и гетерозиготными по мутантному аллелю множественного разветвления, также включены в настоящий документ, поскольку такие растения полезны для получения гомозиготных растений.

Аналогичным образом в настоящий документ включены растения арбуза, которые являются гомозиготными по мутантному аллелю *Clhws* и гетерозиготными по мутантному аллелю множественного разветвления.

ВЕГЕТАТИВНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ И КУЛЬТУРА РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Диплоидные растения-опылители также можно размножить вегетативно (клонально), и такие вегетативно размножаемые растения или «результаты вегетативного размножения» являются вариантом осуществления изобретения. Их легко отличить от других растений арбуза по наличию мутантного аллеля *Clhws* и/или по фенотипу. Присутствие одного или нескольких мутантных аллелей *Clhws* можно установить, как описано по тексту настоящего документа.

Вегетативное размножение можно выполнять разными способами. Например, один или несколько отростков растения по настоящему изобретению можно привить на другой подвой, например, устойчивый к биотическому или абиотическому стрессу подвою.

Также могут использоваться методы культивирования клеток или тканей *in vitro* и регенерация результатов вегетативного размножения таких культур. Такие культуры клеток или тканей включают или состоят из различных клеток или тканей растения по изобретению. В одном из аспектов такая культура клеток или тканей включает или состоит из вегетативных клеток или вегетативных тканей растения по изобретению.

В еще одном аспекте культура клеток или тканей включает или состоит из репродуктивных клеток или тканей, таких как пыльники, пыльца, микроспоры или семязпочки растения по изобретению. Такие культуры можно обрабатывать агентами удвоения хромосом для получения, например, двойных гаплоидных растений, или в качестве альтернативы их можно использовать для получения гаплоидных растений (например, для получения диплоидов из тетраплоида или для получения гаплоидов из диплоида).

Культура клеток или тканей *in vitro* может включать или состоять из клеток, протопластов или растительной ткани из части растения, выбранной из группы, состоящей из: плода, зародыша, меристемы, семядоли, пыльцы, микроспор, семязпочки, листа, пыльника, корня, кончика корня, пестика, цветка, семени, стебля. Также сюда входят части любого из них, такие как, например, только семенная кожура (материнская ткань).

Таким образом, в одном из аспектов изобретения предусмотрена культура клеток или культура ткани клеток растения, содержащая одну или две копии мутантного аллеля *Cllws* полностью согласно описанию выше. Как упоминалось ранее, культура клеток или культура ткани включает клетки или протопласты или растительную ткань из растительной части растения, содержащую мутантный аллель *Cllws* и может включать или состоять из клеток или тканей, выбранных из группы, состоящей из: зародыша, меристемы, семядоли, пыльцы, микроспоры, листа, пыльника, корня, кончика корня, пестика, цветка, семени, стебля; или части любого из них.

Также предусмотрено растение арбуза, регенерированное из такой культуры клеток или культуры ткани, отличающееся тем, что такое регенерированное растение (или его потомство, например, полученное после скрещивания или самоопыления регенерированного растения) содержит мутантный аллель *Cllws*. Следовательно, в одном из аспектов растение арбуза, содержащее мутантный аллель *Cllws* в одной или нескольких копиях представляет собой вегетативно размножаемое растение арбуза.

В другом аспекте клетки и ткани по изобретению (а при необходимости, также и культура клеток или тканей), содержащие мутантный аллель *Cllws* в одной или нескольких копиях, представляют собой неразмножающиеся клетки или ткани.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

Предусмотрен способ получения бессемянных триплоидных плодов арбуза, включающий следующее:

1. предоставление диплоидного растения или семени арбуза, содержащего две копии мутантного аллеля *Clhws*,
2. предоставление триплоидного гибридного (F1) растения или семени арбуза, не содержащего мутантного аллеля *Clhws*,
3. посадка или посев указанных триплоидных гибридных растений в поле (или в теплице, или в туннеле) и посадка или посев диплоидных растений арбуза, полученных на этапе 1, на том же поле (или в теплице, или в туннеле), и, при необходимости,
4. сбор бессемянных плодов арбуза, полученных на триплоидных растениях, при этом плоды образуются после опыления женских цветков пыльцой, содержащей мутантный аллель *Clhws*.

Предусмотрен способ получения плодов арбуза, включающий следующее:

1. предоставление диплоидного растения или семени арбуза, содержащего две копии мутантного аллеля *Clhws*,
2. предоставление растения или семян арбуза, не включающих мутантного аллеля *Clhws* (включает только аллели *Clhws* дикого типа),
3. использование пыльцы, содержащей мутантный аллель *Clhws*, который необходимо перенести на женские цветки растения на этапе 2 (насекомыми или вручную), при необходимости
4. сбор плодов арбуза, полученных на растениях, при этом плоды образуются после опыления женских цветков пыльцой, содержащей мутантный аллель *Clhws*.

Также предусмотрен способ получения растения арбуза, способного давать высокий процент мужских цветков или только мужские цветки, или способ получения мутантных аллелей гена *ClHWS*, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений арбуза или создание мутантной популяции растений арбуза; или предоставление растений арбуза,

содержащих случайно или целенаправленно индуцированные мутации в целевом гене *ClHWS*,

- b) селекция растения, содержащего мутантный аллель гена *Clhws*;
- c) при необходимости, проверка того, дает ли выбранное в пункте b) растение более высокий процент мужских цветков, когда мутантный аллель *Clhws* находится в гомозиготной форме, по сравнению с контрольным растением, которое содержит аллели гена *ClHWS* дикого типа.

Растение арбуза, содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *Clhws*, полученную вышеуказанным способом, и/или же сюда включается мутантный аллель *Clhws*, индуцированный и идентифицированный вышеуказанным способом.

Популяция растений арбуза согласно пункту a) предпочтительно представляет собой один генотип культивируемой линии скрещивания или сорта арбуза, который обрабатывается/был обработан (или подвергнут воздействию) мутагенным средством, или потомство такой популяции, например, полученное после самоопыления особей популяции для получения растений M2, M3 или растений дальнейших поколений. Например, это может быть популяция TILLING. Это также может быть линия арбуза, которая была подвергнута целевой геной модификации с использованием, например, методов на основе Crispr.

На этапе b) селекция растения, содержащего мутантный аллель гена *Clhws*, может осуществляться по фенотипу и/или путем скрининга растений (или частей растений или их ДНК) на наличие мутантного аллеля гена *Clhws*, т.е. аллеля, который имеет сниженную экспрессию, либо не экспрессирует аллель *ClHWS* дикого типа, или аллеля, кодирующего мутантный белок *ClHWS*.

Что касается скрининга по фенотипу или комбинации фенотипов, предполагается, что они могут быть выбраны только в том случае, если мутантный аллель *Clhws* находится в гомозиготной форме, и если мутантный аллель имеет пониженную экспрессию или не демонстрирует ее, или кодирует белок с пониженной функцией или с ее отсутствием, в результате чего можно увидеть фенотип или комбинацию фенотипов. Скрининг по фенотипу или комбинации фенотипов можно проводить согласно описанию, например, путем выращивания линии, содержащей мутантный аллель *Clhws* в гомозиготной форме в тех же

условиях роста, что и контрольная линия или сорт, содержащий аллель *ClHWS* дикого типа в гомозиготной форме, а затем проведения анализа по одной или нескольким из указанных далее вариантов: а) подсчет мужских и женских экземпляров, развивающихся в течение определенного периода (периода, в течение которого контрольное растение производит мужские и женские цветки), б) оценка того, насколько часто мужские цветки имеют сросшиеся лепестки или другой фенотип мужских цветков в мутантной линии, и/или с) оценка того, отличается ли мутантная линия формой листьев.

Относительно скрининга или отбора растений на предмет наличия мутантного аллеля гена *ClHWS*, это можно сделать различными методами, которые позволяют обнаружить ДНК, РНК или белок *ClHWS*, например, путем создания праймеров для ПЦР, которые амплифицируют часть кодирующей области или всю кодирующую область для амплификации геномной ДНК, чтобы определить, содержит ли растение мутацию в геномной ДНК, или другими методами.

Таким образом, для определения наличия или выбора растения, содержащего мутантный аллель *Clhws*, можно использовать различные методы. Например, можно провести маркерный анализ или анализ последовательности хромосомной области, содержащей locus *ClHWS*, или можно использовать ПЦР или ПЦР с обратной транскрипцией для амплификации аллеля *Clhws* (или его части) или мРНК (кДНК), или можно выполнить секвенирование. Также можно провести генетический анализ для оценки рецессивного наследования.

Если использовались методы редактирования гена, вектор/конструкт, введенный в растение для индукции мутаций в аллеле, предпочтительно удаляют из линии растений, содержащей мутантный аллель *Clhws*, чтобы линия растений не содержала такого вектора или конструкта.

В еще одном аспекте предусмотрен способ получения семян растения-опылителя, содержащего мутантный аллель *Clhws* в гомозиготной форме, причем указанный способ включает:

- i) использование растения-опылителя, гомозиготного по мутантному аллелю *Clhws*, в качестве мужского родительского растения при скрещивании с женским родительским растением арбуза, которое является гетерозиготным по мутантному аллелю *Clhws*,

- ii) сбор семян, полученных от указанного скрещивания, и, при необходимости,
- iii) отбор из семян или проростков ii) тех, которые являются гомозиготными по мутантному аллелю *Clhws*.

Полученные на этапе ii) семена будут представлять собой смесь семян, содержащих мутантный аллель в гетерозиготной форме (*Clhws/ClHWS*), и семян, содержащих мутантный аллель в гомозиготной форме (*Clhws/Clhws*), с примерно 50% каждого генотипа. Поскольку в одном аспекте партии семян, содержащие мутантный аллель в гомозиготной форме, или сеянцы, содержащие мутантный аллель в гомозиготной форме, предусмотрены для продажи, гетерозиготные семена или сеянцы предпочтительно не используются. В одном из аспектов отбор на этапе iii) может осуществляться с использованием методов неразрушающего генотипирования семян или путем проращивания семян и отбора сеянцев, например, на основе анализа ДНК и/или отбора сеянцев, имеющих видоизмененную форму листьев.

Партия семян, в составе которой имеется большое количество семян, содержащих мутантный аллель *Clhws* в гомозиготной форме, является одним из аспектов изобретения, в котором, по меньшей мере, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% семян в партии являются гомозиготными по мутантному аллелю *Clhws*.

Кроме того, саженцы (например, контейнер, содержащий саженцы, такие как лотки), среди которых большое количество саженцы, содержащих мутантный аллель *Clhws* в гомозиготной форме, отличающиеся тем, что, по меньшей мере, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% саженцев являются гомозиготными по мутантному аллелю *Clhws*.

В одном из аспектов саженцы отбирают на основании видоизмененной формы листьев и помещают, например, в лотки для продажи в качестве растений-опылителей.

Также предусмотрено использование растения арбуза-опылителя согласно описанию для получения бессемянных триплоидных плодов арбуза, при этом пыльца опылителя индуцирует завязывание плодов на женских цветках триплоидных растений.

Также предусмотрено использование мутантного аллеля *Clhws* для создания растений-опылителей арбуза и/или пыльцы для опыления других растений арбуза.

В одном из аспектов растения, части растений и растительные клетки по изобретению не получают исключительно посредством по существу биологического процесса, как определено правилом 28 (2) ЕПК (Европейской патентной конвенции).

В одном из аспектов растения не содержат ГМО (т.е. они не содержат генетической конструкции, введенной в геном посредством трансформации).

В одном из аспектов мутантные аллели формируются путем мутагенеза (например, химического или радиационного мутагенеза) или целевого мутагенеза, особенно с использованием системы CRISPR (например, *Crispr/Cas9* или *Crispr/CpfI* или других нуклеаз). В одном из аспектов культивируемое растение, содержащее мутантный аллель *Clhws*, не является трансгенным растением, т.е. отбирается нетрансгенное потомство, которое не содержит, например, конструкта CRISPR.

В одном из аспектов мутантный аллель гена *Clhws* включает мутацию, индуцированную человеком, т.е. мутацию, введенную методами мутагенеза, такими как химический или радиационный мутагенез, или методами направленного мутагенеза, такими как методы на основе *Crispr*.

В настоящем документе предусмотрен способ направленного мутагенеза эндогенного гена *Clhws* в арбузе с использованием любого метода направленной модификации гена, такого как методы на основе CRISPR (например, *Crispr/Cas9* или *Crispr/CpfI*), TALENS, Zinc Fingers или другие методы.

В одном из аспектов предложены выделенный мутантный белок *Clhws* и изолированный белок *Clhws* дикого типа или выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая мутантный белок *Clhws* или белок *Clhws* дикого типа. Также сюда включено антитело, способное связывать мутантный белок *Clhws* или белок *Clhws* дикого типа.

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

В одном из аспектов предусмотрен метод скрининга для выявления и/или отбора семян, растений или частей растений или ДНК из таких семян, растений или частей растений, содержащих в своем геноме мутантный аллель и/или аллель дикого типа гена, кодирующего белок *Clhws*.

Этот метод включает скрининг на уровне ДНК, РНК (или кДНК) или белка с использованием известных способов с целью обнаружения наличия мутантного аллеля и/или аллеля дикого типа. Существует множество методов обнаружения присутствия мутантного и/или аллеля гена дикого типа.

Таким образом, предусмотрен метод скрининга и/или отбора растений или растительного материала или частей растений, или ДНК, или РНК, или белка, полученного из них, на предмет наличия мутантного аллеля *Slhws* и/или аллеля *SlHWS* дикого типа, включающий один или несколько из следующих этапов:

- a) определение генной экспрессии эндогенного гена *SlHWS*, например, чтобы зафиксировать ее уменьшение или утрату;
- b) определение количества белка *SlHWS* дикого типа, например, чтобы зафиксировать его уменьшение или полную утрату;
- c) определение наличия мутантной или дикой мРНК, кДНК или геномной ДНК, кодирующей мутантный или дикий белок *SlHWS*;
- d) определение наличия мутантного и/или дикого белка *SlHWS*;
- e) определение того, демонстрируют ли растения или их потомство мутантный фенотип (согласно описанию) или фенотип дикого типа.

Можно использовать рутинные методы, такие как ПЦР с обратной транскрипцией, ПЦР, анализы на основе антител, секвенирование, анализы генотипирования (например, аллель-специфическое генотипирование), фенотипирование и т.д.

Растения или растительный материал или части растений могут быть представлены растениями арбуза или растительным материалом или частями растений, такими как листья, части листьев, клетки, плоды, части плодов, завязи, стебель, гипокотиль, семя, части семян, семенная кожура, зародыш, и т.д.

Например, если существует разница в один нуклеотид (однонуклеотидный полиморфизм, ОНП) между аллелем дикого типа и мутантным аллелем, то можно использовать анализ генотипирования ОНП, чтобы определить, содержит ли растение, часть растения или клетка нуклеотид дикого типа или мутантный нуклеотид в своем геноме. Например, ОНП можно легко обнаружить с помощью KASP-анализа (см. kpbioscience.co.uk) или других анализов генотипирования ОНП. Для разработки KASP-анализа можно выбрать, например, 70 пар оснований выше и

70 пар оснований ниже области ОНП, а также можно сконструировать два аллель-специфичных прямых праймера и один аллель-специфичный обратный праймер. См., например. Аллен и др. 2011 г., *Plant Biotechnology J.* 9, 1086-1099, особенно с. 097-1098 для получения информации по методу анализа KASP.

В равной степени можно использовать и другие анализы генотипирования. Например, в равной степени можно использовать анализ генотипирования ОНП TaqMan, анализ кривых плавления с высоким разрешением (GDH), массивы генотипирования ОНП (например, Fluidigm, Illumina и т.д.) или секвенирование ДНК.

В одном из аспектов, например, маркер ОНП mWM23348454 в нуклеотиде 101 с SEQ ID NO: 5 или в нуклеотиде 101 последовательности, содержащей, по меньшей мере, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия мутантного аллеля *Clhws*, кодирующего мутантный белок, содержащий мутацию W204STOP в арбузе. На основании разницы между геномной последовательностью аллеля дикого типа и мутантного аллеля специалист в данной области техники может легко разработать маркеры, которые можно использовать для обнаружения конкретных аллелей.

В настоящем документе также предусмотрен способ идентификации растения арбуза (или части растения), содержащего мутантный аллель *Clhws*, способ, включающий обнаружение в растении (или части растения) присутствия мутантного аллеля *Clhws*, отличающийся тем, что присутствие обнаруживается, по меньшей мере, одним маркером в аллеле *Clhws* или путем обнаружения белка, кодируемого аллелем *Clhws*. Способ обнаружения мутантного аллеля *Clhws* выбирают из группы, состоящей из ПЦР-амплификации, секвенирования нуклеиновых кислот, гибридизации нуклеиновых кислот и анализа на основе антител (например, иммуноанализа) для обнаружения белка ClHWS, кодируемого аллелем.

В настоящем документе также предусмотрен способ идентификации растения арбуза (или части растения), содержащего мутантный аллель *Clhws*, содержащий мутацию в регуляторном элементе, причем этот способ включает обнаружение в растении (или части растения) пониженной экспрессии гена или отсутствия экспрессии гена мутантного аллеля *Clhws*, отличающегося тем, что его

присутствие определяют по уровням мРНК (кДНК) в аллеле *СНWS* дикого типа или путем определения уровней белка СНWS дикого типа. Способ обнаружения мутантного аллеля *СНws* выбирают из группы, состоящей из ПЦР-амплификации (например, ПЦР с обратной транскрипцией), секвенирования нуклеиновых кислот, вестерн-блоттинга и анализа на основе антител (например, иммуноанализа) для обнаружения белка СНWS, кодируемого указанным аллелем.

Также предусмотрен способ определения, обнаружения или анализа того, содержит ли клетка или ткань растения арбуза или часть растения мутантный аллель гена под названием СНWS, кодирующего белок с SEQ ID NO: 1, или белок, содержащий, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. В одном из аспектов способ включает определение экспрессии аллеля, и/или определение кодирующей последовательности аллеля, и/или определение части кодирующей последовательности аллеля (например, генотипа ОНП аллеля), и/или определение аминокислотной последовательности продуцируемого белка и/или количество продуцируемого белка.

Для выявления наличия в растении или его части мутантный аллель *СНws* по изобретению можно использовать различные методы. Как упоминалось ранее, можно определить уровень мРНК (или кДНК) аллеля дикого типа или же уровень белка дикого типа, чтобы оценить, имеет ли место пониженная экспрессия или ее отсутствие в аллеле дикого типа. Кроме того, можно проанализировать кодирующую последовательность или ее часть, например, если уже известно, какой мутантный аллель может присутствовать, можно разработать анализ для обнаружения мутации, например, анализ генотипирования ОНП может, например, различить наличие мутантного аллеля и аллеля дикого типа, например, генотипирование по маркеру mWM23348454.

Способ отбора растения или части растения, включающий следующие этапы:

а) выявление растения или части растения, которая имеет мутацию в аллеле, кодирующем белок СНWS, отличающийся тем, что аллель гена дикого типа кодирует белок СНWS, включающий, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любым из белков, выбранных из группы: SEQ ID NO:1, и, при необходимости,

b) определение того, обеспечивает ли растение или растение-потомок на выходе более высокий процент мужских цветков, чем растение, не имеющее мутантного аллеля *Clhws* (являющееся гомозиготным по аллелю *Clhws* дикого типа) и/или цветы со сросшимися лепестками, или другой фенотип мужских цветков, и/или листья другой формы и, при необходимости,

c) отбор растения, содержащего, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля, полученного на этапе a).

Способ получения растения, включающий следующие этапы:

a) внесение мутаций в популяцию растений,

b) отбор растения, обеспечивающего более высокий процент мужских цветков и/или цветков со сросшимися лепестками и/или листьями и/или содержащего мутантный аллель *Clhws*,

c) при необходимости, проверка того, имеет ли растение, выбранное на этапе b), мутацию в аллеле, кодирующем ген, кодирующий белок *ClHWS*, и выбор растения, содержащего такую мутацию, и, при необходимости,

d) выращивание/культивирование растений, полученных по этапу c),

отличающийся тем, что аллель гена дикого типа кодирует белок *ClHWS*, содержащий, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с белком: SEQ ID NO:1.

Способ получения растения, включающий следующие этапы:

a) введение молекулы чужеродной нуклеиновой кислоты в растение, при этом молекула чужеродной нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из следующего:

i) молекулы ДНК, которые кодируют, по меньшей мере, одну антисмысловую РНК, вызывающую снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок *ClHWS*;

ii) молекулы ДНК, которые посредством эффекта ко-супрессии приводят к снижению экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок *ClHWS*;

iii) молекулы ДНК, кодирующие, по меньшей мере, один рибозим, расщепляющий специфические транскрипты эндогенного гена, кодирующего белок С1НWS;

iv) молекулы ДНК, которые одновременно кодируют, по меньшей мере, одну бессмысловую РНК и, по меньшей мере, одну смысловую РНК, отличающиеся тем, что указанная бессмысловая РНК и указанная смысловая РНК образуют двухцепочечную молекулу РНК, которая вызывает снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок С1НWS (технология РНКi);

v) молекулы нуклеиновой кислоты, введенные посредством мутагенеза *in vivo*, которые приводят к мутации или вставке гетерологичной последовательности в эндогенный ген, кодирующий белок С1НWS, отличающиеся тем, что мутация или вставка вызывает снижение экспрессии гена, кодирующего белок С1НWS или приводит к синтезу белка С1НWS с утраченной или пониженной функцией;

vi) молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитело, отличающееся тем, что антитело приводит к снижению активности эндогенного гена, кодирующего белок С1НWS, вследствие связывания антитела с эндогенным белком С1НWS;

vii) молекулы ДНК, которые содержат транспозоны, отличающиеся тем, что интеграция этих транспозонов приводит к мутации или вставке в эндогенный ген, кодирующий белок С1НWS, в результате чего происходит снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок С1НWS, или это приводит к синтезу неактивного белка;

viii) Молекулы Т-ДНК, которые вследствие вставки в эндогенный ген, кодирующий белок С1НWS, вызывают снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок С1НWS, или приводят к синтезу белка С1НWS с утраченной или пониженной функцией;

ix) молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие эндонуклеазы редкого расщепления или специально разработанные эндонуклеазы редкого расщепления, предпочтительно мегануклеазу, TALEN или систему CRISPR/Cas.

b) отбор растения или потомства растения, отличающегося тем, что растение или потомство растения обеспечивает на выходе более высокий процент

мужских цветков и/или цветков со сросшимися лепестками или мужских цветков с другим фенотипом и/или листьями, при необходимости

с) проверка растения или потомства, выбранного в соответствии с пунктом b), на предмет наличия в нем пониженной активности белка ClHWS, по сравнению с растениями дикого типа, в геном которых, например, не были интегрированы молекулы чужеродной нуклеиновой кислоты, при необходимости

d) выращивание/культивирование растений, полученных согласно этапу с).

В настоящий документ включено растение, полученное любым из вышеуказанных способов.

В одном из аспектов предложено генетически модифицированное растение и часть растения, в результате чего в растении снижена или отсутствует экспрессия эндогенного гена ClHWS, например, за счет подавления эндогенного гена ClHWS. В качестве такого растения может выступать любое растение, и в одном из аспектов оно представляет собой арбуз. Однако это также могут быть огурцы, дыни, перец, кукуруза, соя, пшеница, рапс, помидоры, хлопок и т.д.

В еще одном аспекте предложено растение и часть растения арбуза, содержащие мутацию в эндогенном гене ClHWS, например, индуцированную мутацию, вызванную, например, целевым мутагенезом, в результате чего либо экспрессия гена снижается или прекращается, либо экспрессируемый ген кодирует пониженную функцию или утрату функции белка ClHWS, по сравнению с белком дикого типа.

В настоящем документе также предусмотрен способ скрининга (например, генотипирования) геномной ДНК растений, семян или частей растения 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, причем 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 гена Clhws и могут

гибридизоваться с геномным аллелем и/или амплифицировать часть геномного аллеля в ПЦР-анализе, и

- c) проведение ПЦР-анализа с использованием пары праймеров или анализа гибридизации с использованием зонда согласно этапу b) на образце(ах) этапа a) и, при необходимости,
- d) выбор растения или части растения или семени, содержащего одну или две копии аллеля (например, аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля) гена *Clhws* в геноме,

отличающийся тем, что аллель дикого типа гена *Clhws* кодирует белок с SEQ ID NO: 1.

На этапе b) пара праймеров ПЦР представляет собой, по меньшей мере, один прямой праймер, дополняющий одну из цепей ДНК аллеля *Clhws*, и один обратный праймер, дополняющий другую цепь ДНК аллеля *Clhws*, причем эта пара праймеров гибридизуется с денатурированной геномной ДНК и амплифицирует часть аллеля *Clhws* в реакции ПЦР. Праймеры могут разрабатываться для амплификации аллеля дикого типа или любого мутантного аллеля *Clhws* с использованием инструментов разработки праймеров. В одном из аспектов используются два прямых праймера: один предназначен для амплификации аллеля дикого типа, другой – для амплификации мутантного аллеля гена *Clhws*, а также один общий обратный праймер. Эти три праймера можно использовать в KASP-анализе для генотипирования образцов, полученных на этапе a). Таким образом, в одном из аспектов анализ на этапе c) представляет собой KASP-анализ, но при этом могут использоваться и другие анализы генотипирования, например, описанные на сайте по адресу biosearchtech.com/sectors/agrigenomics/agrigenomics-pcr-qpcr-technologies.

В одном из аспектов анализ позволяет различать мутантный аллели гена *Clhws* и аллель дикого типа, например, аллель *Clhws* дикого типа с SEQ ID NO: 4 и мутантный аллель *Clhws*, согласно описанию в настоящем документе.

Для анализа геномной ДНК может потребоваться, по меньшей мере, необработанная экстракция геномной ДНК. Присутствие мутантного аллеля или аллеля дикого типа в геномной ДНК можно обнаружить прямо или косвенно. Прямое обнаружение, например, может осуществляться путем гибридизации нуклеиновых кислот, например, олигонуклеотидных зондов. В качестве косвенного способа может

использоваться, например, амплификация нуклеиновой кислоты с применением, например, праймеров ПЦР, которые содержат, например, хвостовую последовательность, присоединенную к праймеру, и в ходе проведения ПЦР аллель-специфичный праймер связывается с матричной ДНК и удлиняется, тем самым присоединяя хвостовую последовательность к вновь синтезированной цепи и в последующих раундах ПЦР кассета FRET (кассета флуоресцентной резонансной передачи энергии) связывается с хвостом и излучает флуоресценцию. После этого можно обнаружить флуоресцентный сигнал. Это используется, например, в KASP-анализе.

Мутантный аллель может отличаться от аллеля дикого типа в различных аспектах, например, по последовательности промотора, или по последовательности, кодирующей белок, или по сайтам сплайсинга интрона/экзона. Мутантный аллель может иметь пониженную экспрессию гена или не иметь такой экспрессии, или это может приводить к получению белка, содержащего одну или более удаленных, замененных или вставленных аминокислот, по сравнению с белком дикого типа.

В одном аспекте мутантный аллель представляет собой аллель, кодирующий белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, замененных или удаленных относительно белка дикого типа, как описано по тексту настоящего документа, например, см. аллели, кодирующие мутантные белки, в Таблице А или другие аллели, описанные в настоящем документе.

Также предусмотрены способы получения и/или отбора растений или частей растений, содержащих в своем геноме, по меньшей мере, один мутантный аллель гена *Clhws* арбуза.

В одном из аспектов также предусмотрен способ обнаружения присутствия в геноме аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена арбуза *Clhws*.

В одном из аспектов предусмотрен способ определения того, содержит ли растение или часть растения или семя арбуза, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа, кодирующего белок с SEQ ID NO: 1, и/или содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля (согласно описанию в настоящем документе), и, при необходимости, выбора растения, части растения или семени, содержащего, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля.

Кроме того, предусмотрен KASP-анализ (конкурентный аллель-специфический ПЦР-генотипический конкурентный анализ Kbioscience), включающий два аллель-специфичных прямых праймера, например, праймер FAM и праймер VIC и общий обратный праймер. Также см. Примеры. Аллель-специфические праймеры можно легко разработать для обнаружения и/или различия между аллелем дикого типа (кодирующим, например, белок с SEQ ID NO: 1) и мутантным аллелем, содержащим, например, одну или более аминокислот, замененных, дублированных, удаленных или вставленных относительно белка дикого типа.

Аналогичным образом в настоящий документ включены выделенные последовательности или молекулы геномной последовательности (дикого типа или мутантной), последовательность кДНК или мРНК, белковые последовательности, а также олигонуклеотидные праймеры или зонды для обнаружения аллелей гена Clhws арбуза дикого или мутантного типа.

Также предусмотрен способ получения продукта ПЦР-амплификации и/или продукта олигонуклеотидной гибридизации (части) геномной ДНК растений, семян или частей растения 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, по меньшей мере, одного олигонуклеотидного зонда, причем эти праймеры или (олигонуклеотидный) зонд включают, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или более последовательных нуклеотидов геномного аллеля гена Clhws и могут гибридизоваться с геномным аллелем и/или амплифицировать часть геномного аллеля в ПЦР-анализе, и
- c) проведение ПЦР-анализа с использованием пары праймеров или анализа гибридизации с использованием зонда согласно этапу b) на образце(ах) этапа a) для получения продукта ПЦР-амплификации и/или продукта гибридизации олигонуклеотидов, и, при необходимости,

- d) выбор растения или части растения или семени, содержащего одну или две копии аллеля (например, аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля) гена *Clhws* в геноме,

отличающийся тем, что аллель дикого типа гена *Clhws* кодирует белок с SEQ ID NO: 1.

Кроме того, предусмотрен способ амплификации и/или гибридизации (части) геномной ДНК растений, семян или частей растения 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, по меньшей мере, одного олигонуклеотидного зонда, причем эти праймеры или (олигонуклеотидный) зонд включают, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или более последовательных нуклеотидов геномного аллеля гена *Clhws* и могут гибридизоваться с геномным аллелем и/или амплифицировать часть геномного аллеля в ПЦР-анализе, и
- c) проведение ПЦР-анализа с использованием пары праймеров или анализа гибридизации с использованием зонда согласно этапу b) на образце(ах) этапа a) для получения продукта ПЦР-амплификации и/или продукта гибридизации олигонуклеотидов, и, при необходимости,
- d) выбор растения или части растения или семени, содержащего одну или две копии аллеля (например, аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля) гена *Clhws* в геноме,

отличающийся тем, что аллель дикого типа гена *Clhws* кодирует белок с SEQ ID NO: 1.

Также предусмотрен набор для генотипирования, включающий праймеры и/или зонды и реакционные компоненты для амплификации и/или гибридизации части геномной ДНК гена *Clhws*.

Праймеры и зонды предпочтительно помечают или модифицируют, например, с помощью хвостовой последовательности или метки, чтобы можно было обнаружить продукты реакции амплификации или гибридизации.

В одном из аспектов предусмотрен способ обнаружения и, при необходимости, отбора растения, семени или части растения арбуза, содержащего, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена *Clhws* (*Citrullus lanatus* hws), включающий следующие этапы:

а) предоставление одного или нескольких образцов геномной ДНК одного или нескольких растений, семян или частей растения арбуза,

б) проведение анализа генотипирования с использованием образцов ДНК согласно этапу а) в качестве шаблона, позволяющего различать аллель *Clhws* дикого типа и мутантный аллель *Clhws*, отличающегося тем, что указанный анализ генотипирования основан на амплификации нуклеиновой кислоты с использованием *Clhws*-аллель-специфичных олигонуклеотидных праймеров, и/или тем, что указанный анализ генотипирования основан на гибридизации нуклеиновых кислот с использованием *Clhws* аллель-специфичных олигонуклеотидных зондов, и, при необходимости,

с) отбор растения, семени или части растения, содержащего одну или две копии мутантного аллеля,

отличающийся тем, что аллель *Clhws* дикого типа содержит последовательность с SEQ ID NO: 4, а мутантный аллель *Clhws* содержит один или несколько нуклеотидов, вставленных, дублированных, удаленных или замененных по отношению к последовательности с SEQ ID NO: 4.

В приведенном выше методе указанные *Clhws*-аллель-специфичные олигонуклеотидные праймеры или указанные *Clhws*-аллель-специфичные олигонуклеотидные зонды могут содержать, по меньшей мере, 10 нуклеотидов с SEQ ID NO: 4 или комплементарную цепь с SEQ ID NO: 4.

В описанном выше способе мутантный аллель может содержать, по меньшей мере, один кодон, вставленный или дублированный в кодирующей области аллеля, или, по меньшей мере, один кодон, замененный на другой кодон, или, по меньшей мере, один кодон, удаленный или замененный на стоп-кодон.

Мутантный аллель, например, кодирует белок Таблицы А или другой белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, удаленных или замененных по отношению к функциональному белку Clhws дикого типа согласно описанию в настоящем документе.

Олигонуклеотидные праймеры или олигонуклеотидные зонды могут содержать, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, которые являются комплементарными по отношению к последовательности SEQ ID NO: 4 или к комплементарной последовательности с SEQ ID NO: 4.

Анализ генотипирования в одном аспекте представляет собой KASP-анализ, причем указанный KASP-анализ включает первый прямой праймер, выявляющий аллель дикого типа с SEQ ID NO: 4 в образце ДНК, второй прямой праймер, выявляющий мутантный аллель, содержащий один или несколько нуклеотидов, вставленный, удаленный или замененный по отношению к SEQ ID NO: 4 в образце ДНК, и один общий обратный праймер.

Кроме того, предусмотрен синтезированный праймер или зонд нуклеиновой кислоты, отличающийся тем, что указанный праймер или зонд содержат, по меньшей мере, 15 нуклеотидов с SEQ ID NO: 4 или комплементарной последовательности с SEQ ID NO: 4.

Также в область действия изобретения входит способ обнаружения и, при необходимости, отбора растения, семени или части растения арбуза, содержащего, по меньшей мере, одну копию аллеля Clhws дикого типа и/или мутантного аллеля *Clhws* гена под названием (*Citrullus lanatus hws*), включающий следующие этапы:

а) предоставление одного или нескольких образцов геномной ДНК одного или нескольких растений, семян или частей растения арбуза,

б) проведение анализа генотипирования с использованием образцов ДНК согласно этапу а) в качестве шаблона, отличающегося тем, что указанный анализ генотипирования основан на амплификации нуклеиновой кислоты с использованием *Clhws*-аллель-специфичных олигонуклеотидных праймеров, и/или тем, что указанный анализ генотипирования основан на гибридизации нуклеиновых кислот с использованием *Clhws* аллель-специфичных олигонуклеотидных зондов, и, при необходимости,

с) отбор растения, семени или части растения, содержащего одну или две копии мутантного аллеля,

отличающийся тем, что аллель *Clhws* дикого типа кодирует белок с SEQ ID NO: 1, а мутантный аллель *Clhws* содержит одну или более аминокислот, вставленных, удаленных или замененных по отношению к последовательности с SEQ ID NO: 1.

В приведенном выше способе указанные *Clhws*-аллель-специфичные олигонуклеотидные праймеры или указанные *Clhws*-аллель-специфичные олигонуклеотидные зонды содержат, по меньшей мере, 10 нуклеотидов последовательности с SEQ ID NO: 4 или комплементарной цепи данной последовательности.

Также одним из аспектов является способ выявления или обнаружения культивируемого растения арбуза, части растения или семени (или ДНК любого из них), содержащего мутантный аллель *Clhws*, согласно которому выполняется:

- скрининг растения арбуза, части растения или семени (или ДНК любого из них) с использованием анализа молекулярных маркеров, обнаруживающий, по меньшей мере, один из маркеров ОНП, который отличает мутантный аллель *Clhws* от аллеля *Clhws* дикого типа; и
- выявление и/или отбор растения, части растения или семян, содержащих нуклеотид ОНП, который специфичен для мутантного аллеля *Clhws*.

В одном из аспектов способ включает отбор растений, частей растений или семян, содержащих две копии мутантного аллеля *Clhws*. В одном из аспектов способ используется для отделения семян или растений, содержащих две копии мутантного аллеля *Clhws*, от других растений или семян.

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO 1: белок ClHWS арбуза дикого типа

SEQ ID NO: 2: мутантный белок ClHWS арбуза, содержащий W204STOP

SEQ ID NO: 3: кДНК, кодирующая белок ClHWS дикого типа

SEQ ID NO 4: геномная ДНК, кодирующая белок CIHWS дикого типа; нуклеотиды 610, 611 и 612 в этой последовательности дикого типа представляют собой TGG (кодон для W). В последовательности, кодирующей белок W204STOP, нуклеотид 611 мутирован до А, и таким образом нуклеотиды 610, 611 и 612 представляют собой TAG (стоп-кодон).

SEQ ID NO 5: Маркер ОНП mWM23348454 в нуклеотиде 101 (G/A) для обнаружения мутантного аллеля *Cllws*, или аллеля *CIHWS* дикого типа. В аллеле дикого типа кодон TGG кодирует W, W204 с SEQ ID NO: 1. В мутантном аллеле G заменен на А (G→А), и полученный мутантный кодон TAG является стоп-кодоном. Таким образом, маркер ОНП содержит А в нуклеотиде 101 с SEQ ID NO: 5 или в эквивалентном нуклеотиде последовательности, содержащей, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, который можно использовать для обнаружения мутантного аллеля *Cllws*, тогда как маркер ОНП, содержащий G в нуклеотиде 101 с SEQ ID NO: 5 или в эквивалентном нуклеотиде последовательности, содержащей, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, может использоваться для обнаружения аллеля *CIHWS* дикого типа.

SEQ ID NO 6: аминокислотная последовательность Arabidopsis At3g61590

SEQ ID NO 7: белок под названием C1CG05G000990

SEQ ID NO 8: геномная ДНК, которая по описанию кодирует белок C1CG05G000990. Нуклеотид 1188 до конца последовательности (нуклеотид 2405) соответствует SEQ ID NO: 4. Нуклеотиды 1188, 1189 и 1190 являются кодонами, инициирующими трансляцию SEQ ID NO: 4. Нуклеотиды 1797, 1798 и 1799 соответствуют нуклеотидам 610, 611 и 612 в SEQ ID NO: 4. Следовательно, замена нуклеотида 1798 с G на А соответствует замене нуклеотида 611 с G на А (TGG →TAG).

SEQ ID NO 9: мутантный белок множественного разветвления, содержащий дубликацию 8 аминокислот, по сравнению с белком множественного разветвления дикого типа

SEQ ID NO: 10: геномная ДНК, кодирующая мутантный белок множественного разветвления SEQ ID NO: 9

SEQ ID NO 11: белок множественного разветвления дикого типа

SEQ ID NO 12: геномная ДНК, кодирующая белок множественного разветвления дикого типа SEQ ID NO: 11

Любые патентные заявки, патенты и публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в него посредством ссылки. Особенно в патентных заявках и патентах, в которых упоминается мультиветвленный аллель (или аллель НМБН, или аллель DWARF14), который приводит к мультиветвлению (также называемому ростом мультиветвленного типа), когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме. В одном аспекте ген расположен на хромосоме 8 генома арбуза, в частности, в области, начинающейся с основания 28794281 и заканчивающейся основанием 28795173 хромосомы 8 сорта Чарльстон Грей.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Мутантная популяция арбуза (выведенная с помощью обработки этилметансульфонатом) была проверена методом прямого скрининга в Италии, в результате чего был обнаружен один мутант с измененной формой листьев.

Было выбрано одно растение с измененной формой листьев, которое использовалось для картирования нескольких популяций F2 в разных фоновых генотипах.

QTL картировали на участке размером 0,27 Мб на 1,5 сантиморгана на хромосоме 5.

В этом интервале произошло две мутации: одна была межгенной, а другая привела к появлению преждевременного стоп-кодона в кодирующем белок гене.

В базе данных генома Чарльстона Грея *cucurbitgenomics.org* этот ген получил обозначение C1CG05G000990. Тем не менее, дальнейший анализ данных РНК показал, что ген был неправильно аннотирован в базе данных и что белок, содержащий преждевременный стоп-кодон, был короче белка в базе данных. Было обнаружено, что длина белка составляет 405 аминокислот, тогда как длина белка, кодируемого C1CG05G00090, составляла 446 аминокислот, поскольку иницирующий кодон ATG находился на 1187 нуклеотидов выше иницирующего кодона ATG идентифицированного гена, и, кроме того, в расположенной выше

области там присутствовал интрон, тогда как идентифицированная в настоящем документе последовательность гена не содержала интрона.

BLAST-анализ обнаруженного в настоящем документе гена установил, что ген *Arabidopsis At3g61590* является наиболее сходным белком (SEQ ID NO: 6). *At3g61590* кодирует белок под названием *HAWAIIAN SKIRT (AtHWS)*. Поэтому выявленный в настоящем документе ген арбуза также был назван здесь *CIHWS*.

Мутантный аллель *CIHWS* оказался совершенно уникальным для этой линии при сравнении со 107 линиями, секвенированными по всему геному.

Фенотип растения, которое является гомозиготным по мутантному аллелю *Clhws*, заключался в том, что форма листа отличалась от дикого типа (это был фенотип, впервые идентифицированный и картированный для обнаружения гена), а также в том, что растение во время своего развития не производило женских цветков. У образующихся мужских цветков часто встречались сросшиеся лепестки, и мужские цветки продолжали развиваться в течение вегетационного периода. Позже в ходе вегетационного цикла иногда появлялись женские цветки, но плоды на них не образовывались.

Поскольку линия растений давала мужские цветки, она была воспроизведена путем использования ее пыльцы для опыления женских цветков растения, гетерозиготного по мутантному аллелю. Около 50% семян, развившихся в плодах скрещивания, были гомозиготными по мутантному аллелю *Clhws* и продемонстрировали фенотип исходной мутантной линии.

Был разработан маркер для выявления мутантного аллеля, при селекции кодирующего укороченный белок W204STOP. Маркер был разработан на ОНП в нуклеотиде 611 SEQ ID NO: 4 (геномная последовательность), при этом генотип ОНП AA указывает на наличие мутантного аллеля в гомозиготной форме, а GG указывает на присутствие аллеля дикого типа в гомозиготной форме. Таким образом, маркер ОНП отличает кодон TGG от кодона TAG, т.е. W в аминокислоте 204 от стоп-кодона.

маркер mWM23348454 – SNP [A/G] на нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 5

tctgattata gtgcacttgc aatttctgta aacaggggtt cacacaacta tacaatctct 60
--

gttgtgaaat ccaagcaagt tcctggaaac ttcttcaat [A/G]ggatatatc aattcatatt 120
--

tatgattcgg aaacgatgat gtgggtacc tctctgactg aagtcttgtc gggatggaga 180
 ggtggcgacg agagtgtgat t

Ген *ClHWS* представляет собой одиночный рецессивный ген, фенотип которого сегрегирован с мутантным аллелем *Clhws* у растений, которые являются гомозиготными по мутации (*Clhws/Clhws*) и гомозиготным по А в нуклеотиде 101 с SEQ ID NO: 5 (генотип ОНП 'AA' для ОНП в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 5).

Популяция арбуза TILLING была проверена на наличие дополнительных мутантов в гене ClHWS, в результате чего в линиях M2 был выявлен ряд дополнительных мутантов.

Таблица В

Линия M2	ОНП	Замена кодона	Замена в белке последовательности SEQ ID NO: 1	Область белка, на которую влияет замена	Фенотип, наблюдаемый у гомозиготных растений (Прогноз PROVEAN относительно эффекта замены аминокислот, см. Пример 3)
TP00026	G/A	T <u>G</u> G (W) → T <u>A</u> G (STOP)	W204Stop	Бета- структуры С-концевой области	Преимущественно мужские цветы, измененная форма листьев, сросшиеся лепестки
TP02571-1	G/A	G <u>G</u> G (G) → G <u>A</u> G (E)	G340E	Бета- структуры С-концевой области	Испытания не проводились Provean прогноз: нейтральный

TP04053-1 и/или TP03317-1	G/A	GCT (A) → ACT (T)	A362T	Бета- структуры С-концевой области	Испытания не проводились Provean прогноз: нейтральный
TP04761-1	G/A	TGG (W) → TGA (Stop)	W229Stop	Бета- структуры С-концевой области	измененная форма листа (см. Пример 3)
TP05179-1	G/A	GAG (E) → AAG (K)	E324K	Бета- структуры С-концевой области	Испытания не проводились Provean прогноз: нейтральный
TP05519-1 и/или TP05384-1	C/T	TCT (S) → TTT (F)	S67F	Домен F- box	Испытания не проводились Provean прогноз: вредоносный
TP06018-1	G/A	AGC (S) → AAC (N)	S348N	Бета- структуры С-концевой области	Испытания не проводились Provean прогноз: нейтральный
TP06205-1	G/A	GGA (G) → GAA (E)	G228E	Бета- структуры С-концевой области	Испытания не проводились Provean прогноз: вредоносный
TP07082-1	C/T	CTT (L) → TTT (F)	L242F	Бета- структуры С-концевой области	Испытания не проводились Provean прогноз: нейтральный

TP03386-1	G/A	AGA (R) → AAA (K)	R64K	F-box домен	Испытания не проводились Provean прогноз: нейтральный
	G/A	GTT (V) → ATT (I)	V219I	Бета-структуры С-концевой области	Испытания не проводились Provean прогноз: нейтральный
TP01284-1	G/A	TGC(C)→ TAC(Y)	C69Y	F-box домен	Испытания не проводились Provean прогноз: вредоносный

Белок CIHWS (SEQ ID NO: 1)

MEGQTSWIRHCYNDMSRDLEDLDSYLDFTNEGGKEAVAVSVESILPDDLLERILSYLP
IASIFRAGSVCKRWHDIVSSRRFLWNVSHILSQKPWFMTSSDEPIGYAYDPVLRKW
YAINLPCIDKSNCFIASSCGLVCFMDNDRSELHVCNPITKCSMKLPEPTGSKFSDYS
ALAISVNRVSHNYTISVVKSKQVPGNFFQ**WD**ISIHIDSETMMWVTSLTEVLSGWRGG
DESVICDGVLYLLIYSTGGGAPDNRHGLVTYNISNHSSHGLLIRSFIPAPCSLTCGRL
MNLKQKLVVGGIGKQDRPDIKIGIGIWILCGKEWREIARMPHKFFQGFGEFDDVFAS
CGTDDLIYIQSYGAPALLTFDMNLRQWRWSQKCPVTKRFPLQLFTGFCFEPRLEINP

Геномная последовательность, кодирующая белок CIHWS (SEQ ID NO: 4) с SNP [A/G] в нуклеotide 611, выделена жирным шрифтом (mWM23348454 подчеркнут)

ATGGAGGGACAAACGTCGTGGATAAGGCATTGCTACAATGACATGTCAAGAGATCTTG
AAGATCTCGATTCTTACTTGGATTTACAAATGAAGGAGGCAAAGAGGCTGTAGCAGT
TTCTGTGGAGTCAATCCTGCCTGATGACTTGTGGAACGAATTCTGTCCTATCTACCG
ATAGCAAGCATTTTCAGAGCTGGTTCTGTGTGCAAAGATGGCATGATATAGTTAGTT
CGAGGAGGTTTTTGTGGAATGTCTCACACATCCTATCACAAAACCTTGGTATTTTCAT
GTTTACAAGCTCTGATGAGCCTATTGGTTATGCCTATGATCCGGTTCTTAGAAAGTGG
TATGCTATTAATCTCCCGTGCATCGACAAGTCAAATTGCTTTATTGCCTCGTCATGTG

```

GCTTGGTTTGTTCATGGACAATGACAGTCGAAGTGAGTTACATGTCTGCAACCCTAT
AACCAAATGCTCAATGAAATTACCAGAGCCCACGGGATCGAAGTTCTCTGATTATAGT
GCACTTGCAATTTCTGTAAACAGGGTTTCACACAACSTATAACAATCTCTGTTGTGAAAT
CCAAGCAAGTTCCTGGAAACTTCTTTCAAT [A/G] GGATATATCAATTCATATTTATG
ATTTCGGAAACGATGATGTGGGTACCTCTCTGACTGAAGTCTTGTCTGGGATGGAGAGG
TGGCGACGAGAGTGTGATTTGTGATGGAGTTCTTTACCTCTTAATCTATTCAACTGGG
GGTGGAGCACCTGATAACCGCCACGGTCTTGTACTTATAATATCTCTAACCATCTTT
CTCATGGTCTGTTGATAAGAAGCTTCATTCCTGCTCCCTGTTCTCTCACATGCGGTCTG
ATTGATGAATCTTAAGCAGAAGCTGGTCATGGTTGGGGGAATTGGTAAACAGGATAGG
CCTGACATCATTAAGGGGATTGGAATTTGGATTCTTTGCGGGAAGGAGTGGCGAGAAA
TTGCACGCATGCCCCATAAGTTCTTCCAGGGATTTGGGGAGTTCGACGATGTTTTTGC
CAGCTGCGGCACTGATGACCTTATTTACATCCAGAGCTATGGAGCTCCAGCTTTACTTT
ACGTTTGACATGAATCTAAGACAATGGAGATGGTCGCAGAAGTGCCCAAGTGACAAAGA
GATTCCTCTCCAGCTTTTCACTGGCTTTTGCTTCGAACCAAGGCTTGAGATCAATCC
CTGA

```

Пример 2

Линию, содержащую мутант W204*, скрестили с линией, имеющей другой фоновый генотип, в результате чего получили линии F3, содержащие мутантный аллель в гомозиготной форме. Новый элитный фон представляет собой линию, содержащую рецессивный ген множественного разветвления (также называемый геном Dwarf14 или аллелем НМБН согласно описанию в US7314979B2) в гомозиготной форме. Фенотип мультиветвления вызван мутантным аллелем, который кодирует белок, содержащий дубликацию 8 аминокислот (см. ниже последовательность SEQ ID NO 9, отличающийся тем, что эти 8 аминокислот дублируются: VGHSVSAM). Когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, образуется гораздо больше вторичных ветвей. Вместо примерно 20 образующихся вторичных ветвей (среднее количество вторичных ветвей на расстоянии 90 см от кроны) растение, которое является гомозиготным по мутантному аллелю множественного разветвления, обеспечивает формирование 45 и более вторичных ветвей (среднее количество вторичных ветвей на расстоянии 90 см от кроны).

У сорта Sidekick мутантный аллель множественного разветвления присутствует в гомозиготной форме. Sidekick – это доступный в продаже опылитель, созданный компанией HM Clause. см. сайт по адресу [//hmclause.com/wp-content/uploads/2021/11/USACANADA_Watermelon_Sidekick_Techsheet_2014_ENG.pdf](http://hmclause.com/wp-content/uploads/2021/11/USACANADA_Watermelon_Sidekick_Techsheet_2014_ENG.pdf) или [//hmclause.com/our-product-range.](http://hmclause.com/our-product-range/) / (Соединенные Штаты).

Мутантный многоразветвленный белок / Dwarf14 белок (SEQ ID NO: 9)

MVNNALLEAL	NVRVLGTGDR	SLVLAHGFGT	DQSAWQLIYP	SFTPYRVIL	YDLVCAGSVN	60
PDFDFSRYP	TLDAFVDDLI	SILDSLHVHR	CAFVGHSVSA	MVGHSVSAMV	GILASIRPE	120
LFSKLILIGA	SPRFLNDGDY	HGGFEQSEID	RVFAAMKANY	QSWVNGFAPL	AVGADVPAAV	180
QEFSTRFLNM	RPDISLRFVSK	VIFSSDLRGV	LGLVKVPCCI	IQTAQDVSV	ASVAIYLRDH	240
LGGRNTVEML	DTEGHLPHLS	APQLLVRKLR	RALSR			275

Геномная ДНК, кодирующая мутантный многоразветвленный белок / Dwarf14 белок (SEQ ID NO: 10)

atggttaaca	acgcccttct	tgaagccctt	aatgtccgtg	tctcggcac	cggcgaccgt	60
tctctgggtcc	tggcccatgg	cttcggcacc	gaccagtcog	cttgccaact	catttaccct	120
tcctttactc	cttactaccg	cgtcactcct	tacgaccttg	tctgcccgg	tagcgtcaac	180
cccgacttct	togatttctc	ccgctacacc	actctcgacg	ccttcgtcga	cgatctcacc	240
tccatcctag	actctctcca	cgccaccgcg	tgcgcctttg	tgggcccactc	cgtctccgcc	300
atggtcggcc	actccgtctc	cgccatggtc	ggcactcctg	cctccatccg	ccgtcccga	360
ctctctctca	agctcatctt	aatcggcgcc	tccccagggt	cctttccact	tcacactct	420
gtttttctaa	ctactctgtt	tttttcccct	gtttttataa	aattcttttt	atttttattt	480
ttttcagggt	cctcaacgac	ggcgactacc	acgggtgggt	cgaacagagc	gagattgaca	540
gggtcttcgc	tgcaatgaag	gtaattacc	aatcctgggt	caacggcttt	gccccctctg	600
ctgtcgggtc	cgatgttccc	gctgccgttc	aggaattcag	ccggactctc	ttcaatatga	660
gaccogacat	ttccctcttc	gtctctaagg	tcactttcag	cagcgatctc	cggggagtc	720
tcggctctct	caaaagcccc	tggtgcataa	ttcaaacccg	ccaagacgtc	tctgttccgg	780
cctccgtctc	tatctacctc	cgagaccacc	tcggcggccg	gaacaccgtg	gagatgctcg	840
acaccgaag	ccacctacc	catctgagtg	cccctcagct	actcgtacgg	aaactccgcc	900
gtgctctttc	ccgggtga					917

Многоразветвляющийся белок дикого типа / Dwarf14 белок (SEQ ID NO: 11)

MVNNALLEAL	NVRVLGTGDR	SLVLAHGFGT	DQSAWQLIYP	SFTPYRVIL	YDLVCAGSVN	60
PDFDFSRYP	TLDAFVDDLI	SILDSLHVHR	CAFVGHSVSA	MVGILASIRR	PELFSKLILI	120
GASPRFLNDG	DYHGGFEQSE	IDRVFAAMKA	NYQSWVNGFA	PLAVGADVPA	AVQEFSTRFLF	180
NMRPDISLRFV	SKVIFSSDLR	GVLGLVKVPC	CIQTAQDVS	VPASVAIYLR	DHLGGRNTVE	240
MLDTEGHLPH	LSAPQLLVRK	LRRALSR				267

Геномная ДНК, кодирующая многоразветвляющийся белок дикого типа / Dwarf14 белок (SEQ ID NO: 12)

atggttaaca	acgcccttct	tgaagccctt	aatgtccgtg	tctcggcac	cggcgaccgt	60
tctctgggtcc	tggcccatgg	cttcggcacc	gaccagtcog	cttgccaact	catttaccct	120
tcctttactc	cttactaccg	cgtcactcct	tacgaccttg	tctgcccgg	tagcgtcaac	180
cccgacttct	togatttctc	ccgctacacc	actctcgacg	ccttcgtcga	cgatctcacc	240
tccatcctag	actctctcca	cgccaccgcg	tgcgcctttg	tgggcccactc	cgtctccgcc	300
atggtcggca	tctcgcctc	catccgcctg	ccgcaactct	tctctaagct	catcttaate	360
ggcgccctcc	caaggctcct	tccacttcca	cactctgttt	ttctaactac	tctgtttttt	420
tccctgtttt	ttataaaatt	ctttttattt	ttattttttt	caggttcctc	aacgaacggc	480
actaccacgg	tgggttcgaa	cagagcgaga	ttgacagggt	cttcgctgca	atgaaggcta	540
attaccaate	ctgggtcaac	ggctttgccc	ctcttgctgt	cgggtccgat	gttcccctgt	600
ccgttcagga	attcagccgg	actctctcca	atatgagacc	cgacatttcc	ctctctgtct	660
ctaaggctcat	cttcagcagc	gatctccggg	gagtcctcgg	tctcgtcaaa	gtcccctgtt	720
gcataattca	aaccgcccac	gacgtctctg	ttcggcctc	cgtoctatc	tacctccag	780
accacctcgg	cggccggaac	accgtggaga	tgctogacac	cgaagggcac	ctaccccatc	840
tgagtgcgcc	tcagctactc	gtacggaaac	tccgcctgtc	tctttccgg	tga	893

С мутантом W204* на исходной фоновой линии (обозначенной как линия TP00026-1) и на фоновом генотипе множественного разветвления (обозначенном как линия F3) было проведено полевое исследование. В исследование были включены генетические контрольные растения, не имеющие мутантного аллеля.

Подсчет цветов начинался через 8 недель после пересадки в поле. Раз в неделю в течение трех недель подряд подсчитывались новые раскрытые мужские и женские цветки, которые маркировались биркой, чтобы избежать двойного подсчета. Мужские и женские цветки подсчитывались на двух растениях каждого из четырех генотипов. Для каждого растения мужские и женские цветки подсчитывались на трех ветвях растения. Среднее количество за трехнедельный период показано в Таблице ниже.

Фоновая линия	Фенотип роста	CIWHS (гомозиготный)	Среднее количество мужских цветков (в процентах от общего количества цветков)	Среднее количество женских цветков (в процентах от общего количества цветков)	Соотношение мужских цветков к женским	Соотношение мужских цветков к женским
TR00026-1 линия	Нормальное ветвление	Дикий тип	4,25 (74%)	1,5 (26%)	74% : 26 %	3: 1
TR00026-1 линия	Нормальное ветвление	Мутантный	5,3 (91,4%)	0,5 (8,6%)	91,4% : 8,6 %	11: 1
F3 линия	Множественное разветвление	Дикий тип	5,0 (75,75%)	1,6 (24,25%)	75,75% : 24,25	3: 1
F3 линия	Множественное разветвление	Мутантный	13,3 (100%)	0 (0 %)	100% : 0%	13: 0

Мутантный аллель *CIWHS* (W204*) увеличил среднее количество мужских цветков на 17% в исходной элитной линии и на 24% в линии множественного разветвления, по сравнению с контрольной.

Таким образом, сочетание мутантного аллеля *CIWHS* (в гомозиготной форме) с мутантным аллелем множественного разветвления (в гомозиготной форме) еще больше увеличивает процент мужских цветков, возможно, в результате увеличения числа вторичных ветвей, развивающихся за счет гена множественного разветвления. В US7314979B2 описывается, что мутантный аллель множественного разветвления (в гомозиготной форме) не только увеличивает вторичное ветвление, но также и количество мужских и женских цветков. Однако линия F3 с множественным

разветвлением в гомозиготной форме не имела значительно большего количества мужских и женских цветков, по сравнению с линией с нормальным ветвлением ТР00026-1. А в линии, имеющей комбинацию мутанта множественного разветвления и мутанта Clhws, количество женских цветков было снижено до нуля, а количество мужских цветков значительно увеличено.

Поскольку женских цветков очень мало или вообще нет, на растениях также развивается очень мало или вообще не развиваются плоды. Даже если изредка появляются женские цветки, они обычно не приводят к завязыванию плодов. Это является дополнительным преимуществом при использовании растений в качестве опылителей на полях триплоидных растений, поскольку урожай триплоидных плодов не «загрязняется» диплоидными плодами растения-опылителя. Кроме того, поскольку на каждом растении развивается значительно больше мужских цветков, на участке выращивания требуется меньше растений-опылителей, чтобы обеспечить достаточное количество пыльцы.

Фотографии листьев и мужских цветков линии F3 (фон множественного разветвления) представлены на фигурах 7 и 8.

На Фигуре 7 слева показана более широкая и рассеченная на доли форма листа мутанта, которая также видна на фоне множественного разветвления. На Фигуре 7 справа показана форма листьев дикого типа этой линии множественного разветвления.

На Фигуре 8 (слева) показано, что мужские цветки линии множественного разветвления также выглядят иначе, чем цветки дикого типа линии множественного разветвления (справа).

Пример 3

Два мутанта из Примера 1 были подвергнуты обратному скрещиванию с рекуррентным родителем, после чего гомозиготные или гетерозиготные по мутантному аллелю растения были фенотипированы на момент развития первых настоящих листьев.

Линия обратного скрещивания с рекуррентным родителем	Замена в белке последовательности SEQ ID NO: 1	Область белка, на которую влияет замена	Фенотип, наблюдаемый у гомозиготных растений	Фенотип, наблюдаемый у гомозиготных растений
TR04761-1	W229Stop	Бета-структуры С-концевой области	Форма листьев дикого типа	Более широкие листья с выраженными долями
ТП03386-1	R64K	F-box домен	Форма листьев дикого типа	Форма листьев дикого типа

Этот пример показывает, что мутант W229Stop имеет ту же измененную форму листа, что и мутант W204Stop. Вероятно, на растении также значительно увеличится процент мужских цветков.

Поскольку у этих двух мутантов отсутствуют 202 и 177 аминокислот на С-концевой области белка дикого типа, был сделан вывод, что укороченный белок нефункционален. Следовательно, также весьма вероятно, что, по меньшей мере, любой другой мутантный аллель, который приводит к нокауту экспрессии гена или к выработке нефункционального белка *Clhws* (в гомозиготной форме), обеспечит более высокий процент мужских цветков (или более высокое соотношение мужских цветков к женским), чем у растений, являющихся гомозиготными по аллелю *Clhws* дикого типа. Тем не менее, другие мутантные аллели *Clhws*, например, аллели, которые приводят к пониженной экспрессии генов или функции белка, по сравнению с аллелем дикого типа, также могут обеспечивать более высокий процент развития мужских цветков. Специалист в данной области может легко создать такие мутантные аллели и определить их фенотип, когда аллель находится в гомозиготной форме. Мутант R64K является примером мутанта, который не приводит к изменению формы листьев и, вероятно, также не обеспечивает увеличение процента развития мужских цветков. Это конкретное аминокислотное изменение согласно прогнозируемому

анализу PROVEAN должно быть «нейтральным», т.е. прогнозируется, что оно не меняет функцию белка.

Для мутантов с аминокислотной заменой в Таблице В выше предсказанное влияние аминокислотной замены на функцию белка было проанализировано с помощью анализа PROVEAN с использованием инструмента Provean Protein, который представлен по адресу <http://provean.jcvi.org/index.php>.

Из всех аминокислотных замен только замены S67F, C69Y и G228E были предсказаны как «вредные», т.е. снижающие или устраняющие функцию белка *in vivo*. Такие прогнозы всегда необходимо проверять *in vivo*, поскольку они основаны на предположениях и компьютерном анализе. Эффект S67F, C69Y и G228E будет анализироваться путем выращивания гомозиготных растений и определения фенотипа (по сравнению с растениями, имеющими аллель *Clhws* дикого типа, например, с рекуррентной родительской линией). И наоборот, аминокислотная замена, которая по прогнозам будет иметь «нейтральный» эффект на функцию белка, также может быть ошибочной, т.е. аминокислотная замена вполне может производить эффект *in vivo*, поскольку только около 78% прогнозов анализа PROVEAN подтверждаются в режиме *in vivo*.

Формула изобретения

1. Растение или часть растения арбуза, содержащая, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, именуемого C1HWS, (*Citrullus lanatus HAWAIIAN SKIRT*), **отличающиеся тем**, что указанный мутантный аллель или

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

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

причем указанный мутантный аллель пункта а) или б) обеспечивает увеличение процента развития мужских цветков, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, и причем аллель арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или белок, содержащий, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

2. Растение или часть растения по п. 1, **отличающиеся тем**, что указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, который не имеет функции *in vivo*.

3. Растение или часть растения по п. 1, **отличающиеся тем**, что растение дополнительно содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля множественного разветвления, причем мутантный аллель кодирует белок SEQ ID NO: 9.

4. Растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов, **отличающиеся тем**, что указанный мутантный аллель содержит мутацию в кодоне, кодирующем аминокислоту с номером W204 или W229 SEQ ID NO: 1, или эквивалентную аминокислоту в белке, содержащем, по меньшей мере, 90% идентичности с SEQ ID NO: 1.

5. Растение или часть растения по п. 4, **отличающиеся тем**, что кодон аминокислоты W204 или аминокислоты W229 SEQ ID NO: 1, или эквивалентной

аминокислоты в белке, содержащем, по меньшей мере, 90% идентичности с SEQ ID NO: 1, превращается в стоп-кодон.

6. Растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов, **отличающиеся тем**, что указанный мутантный аллель представляет собой нокаутный аллель, который не экспрессируется.

7. Растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов, **отличающиеся тем**, что мутантный аллель получен путем случайного мутагенеза или целевого мутагенеза, такого как методы, основанные на CRISPR.

8. Растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов, **отличающиеся тем**, что указанное растение или часть растения являются диплоидными и гомозиготными по мутантному аллелю C1HWS и, при необходимости, дополнительно гомозиготными по мутантному аллелю множественного разветвления, причем мутантный аллель кодирует белок SEQ ID NO: 9.

9. Семя, из которого могут быть выращены растение или часть растения по любому из предыдущих пунктов.

10. Пыльца, произведенная растением по любому из предыдущих пунктов.

11. Часть растения по любому из пунктов 1 - 8, **отличающаяся тем**, что часть растения представляет собой клетку, цветок, лист, стебель, черенок, пыльцу, корень, подвой, привой, протопласт, микроспору или пыльник.

12. Вегетативно размножаемое растение, размноженное из части растения по п. 11.

13. Способ получения плодов арбуза, включающий выращивание диплоидного растения арбуза по п. 8 рядом с другим растением арбуза, что позволяет опылять женские цветки указанного другого растения арбуза пыльцой, производимой растением арбуза по п. 8, и, при необходимости, сбора плодов, которые развиваются из указанных женских цветков.

14. Способ по п. 13, **отличающийся тем**, что указанное другое растение арбуза представляет собой триплоидное растение арбуза, и развивающиеся плоды являются бессемянными.

15. Способ скрининга растений, частей растений или их ДНК на предмет наличия мутантного аллеля гена под названием C1HWS или отбора растения или части растения, содержащих мутантный аллель гена под названием C1HWS, или создания растения или части растения, содержащих мутантный аллель гена под названием C1HWS, **отличающийся тем**, что указанный мутантный аллель или

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

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

причем аллель арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 1 или белок, содержащий, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

Фигура 1

ДТ	1	MEGQTSWIRHCYNDMSRDLEDLDSYLDFTNEGGKEAVAVSVESILPDDLL	50
Мутантный	1		50
ДТ	51	ERILSYLPIASIFRAGSVCKRWHDIVSSRRFLWNVSHILSQKPWFYFMFTS	100
Мутантный	51	ERILSYLPIASIFRAGSVCKRWHDIVSSRRFLWNVSHILSQKPWFYFMFTS	100
ДТ	101	SDEPIGYAYDPVLRKWAYAINLPCIDKSNCFIASSCGLVCFMDNDSRSELH	150
Мутантный	101		150
ДТ	151	VCNPITKCSMKLPEPTGSKFSDYSALAISVNRVSHNYTISVVKSKQVPGN	200
Мутантный	151		200
ДТ	201	FFQWDISIHIYDSETMWVTSLTEVLSGWRGGDESVICDGVLYLLIYSTG	250
Мутантный	201	FFQ-----	203
ДТ	251	GGAPDNRHGLVTYNISNHSSHGLLIRSFIPAPCSLTCGRLMNLKQKLMV	300
Мутантный	204	-----	203
ДТ	301	GGIGQDRPDIIKIGIGIWILCGKEWREIARMPHKFFQGFGEFDDVFASCG	350
Мутантный	204	-----	203
ДТ	351	TDDLIIYIQSYGAPALLTFDMNLRQWRWSQKCPVTKRFPLQLFTGFCEPR	400
Мутантный	204	-----	203
ДТ	401	LEINP	405
Мутантный	204	-----	203

Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5



Фигура 7



Фигура 8

