

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393341** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.04.10

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

(22) Дата подачи заявки
2022.06.28

(54) **СПОСОБЫ СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ И ЧАСТЕЙ РАСТЕНИЙ АРБУЗА, СОДЕРЖАЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ГЕН DWARF14**

(31) **63/217,071; 21194565.4**

(32) **2021.06.30; 2021.09.02**

(33) **US; EP**

(86) **PCT/EP2022/067731**

(87) **WO 2023/275048 2023.01.05**

(71) Заявитель:
НУНХЕМС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

**Аллувада Джайасри, Мазахери Мона
(US), Кьяппарино Елена (IT)**

(74) Представитель:

Беляева Е.Н. (BY)

(57) Настоящее изобретение касается способа генотипирования гена DWARF 14 в арбузе, огурце или дыне, который при мутации придает фенотип повышенного вторичного ветвления. Настоящее изобретение также касается растений, содержащих модификации гена DWARF 14.

A1

202393341

202393341

A1

Способы селекции растений и частей растений арбуза, содержащих модифицированный ген DWARF14

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение касается идентификации модифицированного (или мутантного) гена арбуза и способов создания и/или селекции растений и частей растений, содержащих модифицированный (или мутантный) аллель гена или аллель дикого типа гена. Ген обозначается как *DWARF14* или *CIDWARF14* или *CID14*, поскольку предполагается, что ген дикого типа является ортологом гена *Arabidopsis thaliana AtDWARF14 (AtD14)*. У нормальных растений арбуза ген *CID14* дикого типа находится на хромосоме 8 и кодирует белок *CID14*, состоящий из 267 аминокислот. Модифицированный аллель гена был обнаружен у растений арбуза с множественным ветвлением, которые содержали дубликацию 8 аминокислот и, соответственно, белок из 275 аминокислот, см. Фигуру 1. Растения, гомозиготные по этому модифицированному аллелю гена *CID14*, имеют фенотип с множественным ветвлением, где среднее количество второстепенных ветвей равно или превышает 45 второстепенных ветвей. И напротив, растения арбуза, гетерозиготные по модифицированному аллелю или гомозиготные по аллелю дикого типа, имеют нормальный фенотип ветвления, при этом среднее количество вторичных ветвей значительно ниже 45, например, примерно менее 30 вторичных ветвей, например, в среднем около 20 вторичных ветвей.

Другие тыквенные (*Cucurbitaceae*), такие как дыня и огурец, также содержат гены, кодирующие белки D14, обладающие высокой идентичностью последовательности с белком *CID14* арбуза. Они называются, например, генами и белками *CmD14 (Cucumis melo)* или *CsD14 (Cucumis sativus)*. Гены и белки арбуза, огурца и дыни также по тексту настоящей заявки именуются просто ген D14, аллель D14 или белок D14.

Кроме того, неожиданно было обнаружено, что мутантный аллель, который включает дубликацию из 8 аминокислот, фактически кодирует нефункциональный белок *CID14*. Это было неожиданно, поскольку белок D14 представляет собой сложный белок, взаимодействующий с различными другими белками, и не ожидалось, что дубликация 8 аминокислот полностью отменит функцию белка.

При скрининге TILLING-популяции арбуза мутантный аллель, который кодировал усеченный нефункциональный белок (в котором отсутствовало 113 из 267 аминокислот), неожиданно привел к образованию такого же фенотипа с множественным ветвлением, что и мутантный аллель, содержащий дупликацию 8 аминокислот. Оба мутантных аллеля привели к тому, что среднее количество вторичных ветвей составило около 240% по сравнению со средним количеством вторичных ветвей в растении дикого типа (при 100% вторичном ветвлении). Этот сильный фенотип, вызванный нефункциональным белком, в настоящем документе называется «сильным множественным ветвлением» или «полным множественным ветвлением». Кроме того, это открытие позволяет генерировать мутантные аллели, которые приводят не к «полному множественному ветвлению», а к «промежуточному множественному ветвлению», в результате чего белок CID14 имеет пониженную функцию, но потери функции не происходит.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к растениям арбуза, содержащим мутантный аллель гена CID14, что приводит к появлению нефункционального белка CID14 и полному множественному ветвлению (когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме), или содержащим мутантный аллель гена CID14, что приводит к пониженной функции белка CID14 и промежуточному множественному ветвлению (когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме). Растение арбуза, содержащее мутантный аллель, кодирующий нефункциональный белок SEQ ID NO: 1, (CID14ins) в одном аспекте не предусмотрено.

Изобретение в другом аспекте касается способов определения того, содержит ли растение семейства *тыквенные* (*Cucurbitaceae*), особенно растение или часть растения арбуза, дыни или огурца, аллель дикого типа гена D14 и/или мутантный аллель гена D14. Аллель дикого типа гена D14 кодирует белок D14 арбуза с SEQ ID NO: 2 (или белок, который, по меньшей мере, на 95% идентичен SEQ ID NO: 2), белок D14 огурца с SEQ ID NO: 8 (или белок, который, по меньшей мере, на 95% идентичен SEQ ID NO: 8), или белок дыни с SEQ ID NO: 9 (или белок, который, по меньшей мере, на 95% идентичен SEQ ID NO: 9). В одном аспекте мутантный аллель представляет собой аллель, кодирующий дупликацию аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2 (арбуз), SEQ ID NO: 8 (огурец) или SEQ ID NO: 9 (дыня). В другом аспекте мутантный аллель представляет собой аллель,

который кодирует белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, замененных или удаленных по сравнению с белком дикого типа SEQ ID NO: 2 (арбуз), SEQ ID NO: 9 (дыня) или SEQ ID NO: 8 (огурец) и представляет собой белок со сниженной функцией, приводящий к промежуточному множественному ветвлению, когда аллель находится в гомозиготной форме или является нефункциональным белком, что приводит к полному множественному ветвлению, когда аллель находится в гомозиготной форме.

Также предложен способ обнаружения аллеля дикого типа или мутантного аллеля гена D14, при котором пара праймеров либо олигонуклеотидный зонд используются для амплификации или обнаружения аллеля D14 в геномной ДНК арбуза, дыни или огурца. Олигонуклеотидные праймеры или зонды содержат, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более последовательных нуклеотидов SEQ ID NO: 5 или 6 (или комплементарную цепь ДНК любого из них), или SEQ ID NO: 15 или 16 (или комплементарную цепь ДНК любого из них). В частности, предусмотрена пара праймеров, по меньшей мере, один прямой праймер и один обратный праймер, которые гибридизируются с частью геномного аллеля D14 и амплифицируют его в реакции ПЦР.

В другом аспекте способы получения и/или селекции растения *тыквенных (Cucurbitaceae)*, особенно растения арбуза, дыни или огурца, или часть растения содержит мутантный аллель гена D14. В одном аспекте мутантный аллель представляет собой аллель, кодирующий дубликацию аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2 (арбуз), SEQ ID NO: 8 (огурец) или SEQ ID NO: 9 (дыня). В другом аспекте мутантный аллель представляет собой аллель, который кодирует белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, замененных или удаленных по сравнению с белком дикого типа SEQ ID NO: 2 (арбуз), SEQ ID NO: 9 (дыня) или SEQ ID NO: 8 (огурец) и представляет собой белок со сниженной функцией, приводящий к промежуточному множественному ветвлению, когда аллель находится в гомозиготной форме или является нефункциональным белком, что приводит к полному множественному ветвлению, когда аллель находится в гомозиготной форме.

В одном аспекте также предусмотрены растения и части растений арбуза, огурца или дыни, содержащие мутантный аллель гена D14. В одном аспекте

мутантный аллель кодирует белок, содержащий дубликацию аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2 (арбуз), SEQ ID NO: 8 (огурец) или SEQ ID NO: 9 (дыня). В другом аспекте мутантный аллель представляет собой аллель, который кодирует белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, замененных или удаленных по сравнению с белком дикого типа SEQ ID NO: 2 (арбуз), SEQ ID NO: 9 (дыня) или SEQ ID NO: 8 (огурец) и представляет собой белок со сниженной функцией, приводящий к промежуточному множественному ветвлению, когда аллель находится в гомозиготной форме или представлен нефункциональным белком, что приводит к полному множественному ветвлению, когда аллель находится в гомозиготной форме.

В одном аспекте предложено растение арбуза, гетерозиготное по мутантному аллелю гена CID14. В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, содержащий дубликацию аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2 (арбуз). В другом аспекте мутантный аллель представляет собой аллель, который кодирует белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, замененных или удаленных по сравнению с белком дикого типа SEQ ID NO: 2 (арбуз), SEQ ID NO: 9 (дыня) или SEQ ID NO: 8 (огурец) и представляет собой белок со сниженной функцией, приводящий к промежуточному множественному ветвлению, когда аллель находится в гомозиготной форме или представлен нефункциональным белком, что приводит к полному множественному ветвлению, когда аллель находится в гомозиготной форме.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Патент US7314979B2 описывает рецессивный аллель, называемый аллелем HMBN, который в гомозиготной форме увеличивает вторичное ветвление и снижает средний вес плода до 0,87 кг.

Кроме того, WO2006/060425 описывает рецессивный аллель, называемый аллелем HMBN. На странице 15 [0090] аллель HMBN описан как «неожиданный мутантный аллель, возникший в результате проекта по селекции арбузов».

Патентная заявка US2020093086 описывает растения арбуза, дающие мелкие плоды массой менее 0,9 кг за счет сочетания аллеля HMBN в гомозиготной форме и мутантного аллеля ts-гена на хромосоме 2.

Ген и расположение гена аллеля HMBN пока неизвестны. Следовательно, функция гена также неизвестна.

В настоящем документе был идентифицирован ген аллеля HMBN, и было обнаружено, что он кодирует белок CID14, содержащий дубликацию аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2 (белок CID14 дикого типа). Этот мутантный белок показан в SEQ ID NO: 1, и также по тексту настоящей заявки именуется *CID14ins* (обозначает «вставку»).

Белок CID14 дикого типа (SEQ ID NO:2) считается ортологом белка DWARF14 *Arabidopsis*. AtDWARF14 представляет собой белок, который, как было показано, выполняет двойную функцию при передаче сигналов стриголактона и гидролизе стриголактона у *Arabidopsis*, поскольку были созданы мутанты, влияющие на любую из этих функций, см. Seto *et al.* (2019, Nature Communications 10:191, Восприятие и деактивация стриголактона рецептором гидролазы DWARF14). В этой публикации авторы на Фигуре 5 описывают модель участия белка DWARF14 (AtD14) *Arabidopsis* в сигнальном пути стриголактона и его гидролизе. Биоактивная молекула стриголактона воспринимается белком AtD14 и вызывает конформационное изменение белка AtD14, что приводит к образованию белкового комплекса с другими сигнальными белками (такими как D53). Передача сигнала приводит, например, к ингибированию ветвления. После передачи сигнала белок AtD14 возвращается к своей исходной конформации и подвергает гидролизу молекулу стриголактона. Таким образом, AtD14 участвует как в передаче сигнала, например, для ингибирования ветвления, так и в гомеостазе уровней стриголактона в растении. Белок AtD14 содержит 3 аминокислоты, которые называются «каталитической триадой», а именно S97 (серин 97), D218 (аспарагин 218) и H247 (гистидин 247). Они указаны на Фигуре 2 для белка D14 *Arabidopsis* и соответствующих аминокислот в модифицированном белке CID14 арбуза.

Белок арбуза SEQ ID NO: 1 (*CID14 ins*), лежащий в основе фенотипа с множественным ветвлением (вызванного аллелем HMBN), содержит дубликацию 8 аминокислот. Дубликация включает одну из аминокислот каталитической триады, что показано на Фигуре 2, а именно, S97 дублируется. S97 в белке AtD14, по-видимому, расположена на поверхности белка и, по-видимому, участвует в связывании лигандов.

Первоначально заявители предполагали, что, учитывая отсутствие у них привязки к какой-либо теории, возможно, что дубликация 8 аминокислот в белке CID14 изменяет конформацию CID14, за счет чего уменьшается или предотвращается взаимодействие с другими белками/лигандами, или конформация CID14 изменяется таким образом, что влияние оказывается на связывающий карман молекулы стриголактона, что приводит к уменьшению или предотвращению трансдукции сигнала.

Однако при дальнейшем анализе неожиданно обнаружилось, что эффект дубликации 8 аминокислот заключается в том, что белок CID14 *ins* в условиях *in vivo* нефункционален и не может выполнять свою роль при трансдукции сигнала в арбузе. Таким образом, фенотип, наблюдаемый при нахождении мутантного аллеля в гомозиготной форме, представляет собой наиболее радикальное образование вторичной ветви, называемое в настоящем документе «полным множественным ветвлением» или «сильным множественным ветвлением». Такой вывод был сделан на примере мутанта TILLING, у которого кодон аминокислоты W155 мутировался в STOP-кодон (W155STOP или W155*), что привело к образованию усеченного белка, содержащего только аминокислоты с 1 по 154 SEQ ID NO: 2. Белок W155 * должен быть нефункциональным, так как в белке дикого типа отсутствуют 113 аминокислот. Эффект относительно образования (в среднем) вторичной ветви у растений, являющихся гомозиготными по мутантному аллелю W155*, был таким же, как и у растений, содержащих мутантный аллель, кодирующий белок *CID14 ins*. См. примеры.

Поэтому неожиданно было обнаружено, что белок CID14 *ins* (содержащий дубликацию из 8 аминокислот) в условиях *in vivo* нефункционален, т.е. он потерял свою функцию в сигнальном пути стриголактона и больше не передает никакого сигнала, в результате чего ингибирование образования вторичных ветвей не индуцируется и фенотип множественного ветвления выражен в самой полной мере.

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

Аллель HMBN до сих пор использовался для создания растений-опылителей, которые содержат аллель HMBN в гомозиготной форме и имеют фенотип множественного ветвления. Одним из таких опылителей является сорт Sidekick (Harris Moran, см. hmclause.com/wp-content/uploads/2014/11/USACANADA_Watermelon_Sidekick_Techsheetsheet_2014_ENG.pdf). Сорт Sidekick является непригодным для сбора опылителем, поскольку семенные плоды имеют розовую мякоть и отбраковываются.

Коммерческие опылители можно разделить на собираемые и непригодные для сбора (см. также работу McGregor and Waters 2014 *выше*). Опылители пригодные для сбора представляют собой диплоидные опылители, которые при опылении женских цветков дают пригодные к осуществлению семенные плоды. Непригодные для сбора опылители представляют собой диплоидные опылители, которые при опылении женских цветков дают нежелательные с сельскохозяйственной точки зрения плоды, такие как плоды с белой мякотью, плоды с ломкой кожурой и т.д. Таким образом, производитель может выбрать выращивание триплоидных бессемянных плодов и диплоидных плодов с семенами в пределах одного поля или выращивание исключительно триплоидных бессемянных плодов, без использования 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, которые представляют собой компактные растения.

Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что единственный рецессивный ген, присутствующий в сорте Sidekick и лежащий в основе фенотипа множественного ветвления сорта Sidekick, кодирует белок, который содержит дубликацию 8 аминокислот по сравнению с белком дикого типа SEQ ID NO: 2. Модифицированный (или мутантный) белок включен в настоящем документе, как SEQ ID NO: 1. Выравнивание белка дикого типа и мутантного белка показано на Фигуре 1 («D14 *Ins*» представляет собой мутантный белок с SEQ ID NO: 1, а «ДТ» указывает на белок дикого типа SEQ ID NO: 2). Таким образом, геномная ДНК и кДНК/мРНК мутантного гена CID14 (показаны в SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 3) содержат дублирование 24 нуклеотидов по отношению к геномной ДНК дикого типа и кДНК/мРНК (показаны в SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 4).

Авторами настоящего изобретения также было обнаружено, что фенотип множественного ветвления сорта Sidekick связан с белком, который содержит дубликацию 8 аминокислот по сравнению с белком дикого типа SEQ ID NO: 2, в условиях *in vivo* нефункционален, и что фенотип представляет собой «полное множественное ветвление», т.е. передачи сигнала для ингибирования образования вторичных ветвей не происходит. Таким образом, изобретатели впервые смогли создавать различные мутантные аллели (отличные от мутантного аллеля, присутствующего у сорта Sidekick), что приводит к полному множественному ветвлению, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, а также создавать мутантные аллели, которые сохраняют функцию в условиях *in vivo*, но при этом имеют пониженную функцию по сравнению с белком дикого типа и приводят к более умеренному или промежуточному множественному ветвлению, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

С помощью BLAST-анализа были идентифицированы соответствующие белки огурца (CsD14) и дыни (CmD14). Они обладают очень высокой идентичностью последовательности друг с другом (с использованием попарного выравнивания Emboss Needle, параметры по умолчанию), как показано в таблице 1 ниже.

Таблица 1

	CID14 (SEQ ID NO: 2)	CmD14 (SEQ ID NO: 9)	CsD14 (SEQ ID NO: 8)
CID14 (SEQ ID NO: 2)	100%		
CmD14 (SEQ ID NO: 9)	98.5%	100%	
CsD14 (SEQ ID NO: 8)	98.1%	99.6%	100%

Учитывая высокую степень идентичности последовательностей белков, ожидается, что функции белков D14 арбуза, огурца и дыни в условиях *in vivo* будут одинаковыми.

Следовательно, дубликация аминокислот с 94 по 101 в CID14 (SEQ ID NO: 2), CsD14 (SEQ ID NO: 8) и CmD14 (SEQ ID NO: 9) в гомозиготной форме соответственно должна приводить к образованию значительно большего количества вторичных ветвей («полное множественное ветвление»), чем у

растений, являющихся гомозиготными по аллелю дикого типа, кодирующему белок дикого типа. Аналогично, другие мутантные аллели, которые приводят к потере функции белка D14, должны приводить к «полному множественному ветвлению», а мутантные аллели, которые приводят к снижению функции белка D14, должны приводить к «промежуточному множественному ветвлению». На Фигуре 3 показано множественное выравнивание последовательностей мутантного белка CID14 арбуза (SEQ ID NO: 1, *CID14ins* на Фигуре 3) и белков огурца и дыни дикого типа.

В одном аспекте в настоящем документе упоминаются эти мутантные аллели, а также растения и части растений (такие как плоды), содержащие эти мутантные аллели в гомозиготной или гетерозиготной форме.

Таким образом, настоящим документом охвачены любые мутантные аллели в генах CID14, CsD14 или CmD14 и растения, содержащие такие мутантные аллели, особенно мутантные аллели, в которых одна или несколько аминокислот вставлены, удалены, дублированы или заменены по отношению к белку дикого типа с SEQ ID NO: 2 (арбуз CID14), SEQ ID NO: 8 (огурец CsD14) или SEQ ID NO: 9 (дыня CmD14). В одном аспекте вставка, удаление, дупликация или замена одной или более аминокислот приводит к тому, что кодируемый белок представляет собой белок D14 со сниженной функцией или белок D14 с потерей функции в условиях *in vivo*. В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает дупликацию, по тонкой мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или всех 8 аминокислот из аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9. В одном аспекте, по меньшей мере, Ser (S) дублируется в положении 97 CID14, CsD14 или CmD14.

Настоящим документом охвачены дополнительные способы создания мутантных аллелей в генах CID14, CsD14 или CmD14. В частности, способ создания мутантных аллелей, кодирующих белок, который имеет пониженную функцию или утратил ее в условиях *in vivo* и приводит к полному множественному ветвлению (в случае потери функции в условиях *in vivo*) или промежуточному множественному ветвлению (в случае снижения функции в условиях *in vivo*), когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

Также в одном аспекте документом охвачен способ создания мутантных аллелей, кодирующих белок, который включает дубликацию, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или всех 8 аминокислот из аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9. В одном аспекте предусмотрен способ создания мутантного аллеля, при котором аллель кодирует белок, причем, по меньшей мере, Ser (S) дублируется в позиции 97 белка CID14, CsD14 или CmD14 дикого типа.

Также в настоящем документе представлены способы скрининга (например, генотипирования) и/или селекции растений или частей растений или семян на наличие мутантных аллелей и/или аллелей дикого типа гена CID14, CsD14 или CmD14.

Мутантный аллель CID14, CsD14 или CmD14 может включать аллель, кодирующую белок, в котором одна или несколько аминокислот вставлены, дублированы, удалены и/или заменены по сравнению с белком CID14, CsD14 или CmD14 дикого типа, или мутантный аллель CID14, CsD14 или CmD14 может включать одну или более мутаций (вставки, дубликации, делеции и/или замены одного или более нуклеотидов) в регуляторной области гена, такой как промотор или энхансер, что приводит к снижению или отсутствию образования функционального белка дикого типа.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает одну или более замененных, вставленных и/или удаленных аминокислот, при этом белок нефункционален в условиях *in vivo*, а растение, являющееся гомозиготным по мутантному аллелю, демонстрирует полное множественное ветвление. Таким образом, полное множественное ветвление представляет собой полное отсутствие ингибирования образования вторичных ветвей, поскольку в растении отсутствует функциональный D14. Полное множественное ветвление у арбуза, например, рассматривается как примерно 240% от среднего числа вторичных ветвей по сравнению с растением дикого типа (установлено 100% вторичное ветвление), см. примеры. Предпочтительно фенотип растения, содержащего мутантный аллель в гомозиготной форме, и растения, содержащего аллель дикого типа в гомозиготной форме, сравнивают на одном и том же генетическом фоне, так что фоновый геном очень похож и сводит к минимуму различия генотипов.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок D14 дикого типа, и мутантный аллель не экспрессируется в условиях *in vivo*, например, из-за мутаций в регуляторной области (такой как промотор), а растение, гомозиготное по мутантному аллелю, демонстрирует полное множественное ветвление.

Нокаутные аллели D14 или мутантные аллели D14, в результате которых мутация приводит к потере функции белка D14 в условиях *in vivo*, можно легко получить *de novo*, что будет разъясняться в других местах по тексту настоящего документа.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает одну или более замененных, вставленных и/или удаленных аминокислот, при этом белок имеет пониженную функцию в условиях *in vivo*, а растение, являющееся гомозиготным по мутантному аллелю, демонстрирует промежуточное множественное ветвление. Таким образом, промежуточное множественное ветвление не представляет собой полное отсутствие ингибирования образования вторичных ветвей в растении, а мутантный белок D14 сохраняет некоторую функцию в условиях *in vivo* и частично ингибирует образование вторичных ветвей. Промежуточное множественное ветвление у арбуза рассматривается, например, как среднее количество развивающихся вторичных ветвей, находящееся между средним количеством растений дикого типа (гомозиготных по функциональному аллелю D14) и средним числом растений, являющихся гомозиготными по нефункциональному белку D14 или нокаутному аллелю. Например, если растение, являющееся гомозиготным по функциональному аллелю D14, дает среднее количество вторичных ветвей, равное 100%, а растение, являющееся гомозиготным по аллелю, кодирующему нефункциональный белок D14 (или гомозиготным по нокаутному аллелю), дает 240% вторичных ветвей относительно дикого типа, тогда «промежуточное множественное ветвление» обеспечивает среднее количество вторичных ветвей, которое находится между 100% (гомозиготный дикий тип) и 240% (гомозиготный нефункциональный), то есть примерно при не менее 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190% или 200% от среднего количества вторичных ветвей относительно растения дикого типа (установлено на 100% вторичного ветвления), но меньше, чем полное множественное ветвление, см. примеры. Мутантные аллели в гене D14, в результате которых мутация приводит

к снижению функции белка D14 в условиях *in vivo*, могут быть легко получены *de novo*, что будет разъясняться в других местах по тексту настоящего документа.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает одну или более аминокислот, замененных, вставленных и/или удаленных в домене IPR000073, начиная с аминокислоты 22 и заканчивая аминокислотой 259 SEQ ID NO: 2 (арбуз), SEQ ID NO: 8 (огурец) или SEQ ID NO: 9 (дыня).

В одном аспекте мутантный аллель кодирует мутантный белок D14, как показано в таблице 2 или на Фигуре 6.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает одну или более аминокислот, замененных, вставленных и/или удаленных в области аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2 (белок арбуза дикого типа), или SEQ ID NO: 8 (белок огурца дикого типа), или SEQ ID NO: 9 (белок дыни дикого типа).

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает одну или более дублированных аминокислот, выбранных из аминокислот с 94 по 101 из SEQ ID NO: 2 (белок арбуза дикого типа), или SEQ ID NO: 8 (белок огурца дикого типа), или SEQ ID NO: 9 (белок дыни дикого типа).

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все 8 дублированных аминокислоты, выбранных из аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2 (белок CID14 арбуза дикого типа), или SEQ ID NO: 8 (белок огурца дикого типа CsD14), или SEQ ID NO: 9 (белок дыни CmD14 дикого типа). В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает, по меньшей мере, дубликацию серина 97 (S97) SEQ ID NO: 2 (белок арбуза дикого типа) или SEQ ID NO: 8 (белок огурца дикого типа) или SEQ ID NO: 9 (белок дыни дикого типа). В одном аспекте одна или несколько дублированных аминокислот примыкают к аминокислотам дикого типа.

В одном аспекте наличие мутантных аллелей приводят к усилению вторичного ветвления растения арбуза, огурца или дыни, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, по сравнению с растением, которое является гомозиготным по отношению к аллелям дикого типа (кодирующим белки дикого типа CID14, CsD14 и CmD14). В одном аспекте мутантный аллель представляет собой нокаутный аллель или кодирует нефункциональный белок D14, что приводит к полному множественному ветвлению, когда мутантный аллель находится в

гомозиготной форме. В одном аспекте наличие мутантного аллеля приводит к тому, что мутантный белок D14 имеет пониженную функцию по сравнению с белком D14 дикого типа, но по-прежнему сохраняет функцию в условиях *in vivo*, что приводит к промежуточному множественному ветвлению, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

Вышеупомянутые мутантные аллели могут легко создаваться в условиях *de novo*, например, с помощью методов целевого редактирования генов, таких как методы на основе CRISPR, или с помощью мутагенеза, такого как радиационно-индуцированный мутагенез или химически индуцированный мутагенез. Растение, являющееся гомозиготным по мутантному аллелю, можно получить путем самоопыления растения и последующего выращивания гомозиготного растения по сравнению с контрольным растением дикого типа (например, немутантным растением), чтобы определить, больше ли число вторичных ветвей у гомозиготного мутантного растения.

В другом аспекте мутантный аллель *CID14*, *CmD14* или *CsD14* кодирует укороченный белок, при этом, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 или более аминокислот на С-конце белка CID14, CsD14 или CmD14 дикого типа отсутствуют или, при необходимости, заменены другими аминокислотами, что приводит к снижению функции в условиях *in vivo* или к отсутствию функции в условиях *in vivo*.

В другом аспекте мутантный аллель *CID14*, *CmD14* или *CsD14* кодирует белок, при этом, 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, 180, 190, 200 или более аминокислот вставляются в белок CID14, CsD14 или CmD14 дикого типа, дублируются или заменяются в нем или удаляются из него, в результате чего белок имеет пониженную функцию в условиях *in vivo*, или же эта функция у него вообще отсутствует.

Как упоминалось ранее, степень множественного ветвления определяется функциональностью мутантного белка, поэтому наличие нефункционального мутантного белка приводит к максимальному уровню множественного ветвления (далее именуемому полным или сильным множественным ветвлением), в то время как наличие мутантного белка с пониженной функцией будет приводить к более

низкой степени множественного ветвления (далее именуемому промежуточным множественным ветвлением). Таким образом, существует прямая связь между функциональностью D14 и степенью множественного ветвления. Специалист в данной области может легко создать различные мутантные аллели и гомозиготные растения, которые содержат мутантные аллели, а затем выращивать растения и производить селекцию мутантных аллелей, что обеспечивает желаемую степень множественного ветвления.

В одном аспекте изобретения предусмотрено растение или растительная клетка, характеризующееся тем, что растение или растительная клетка обладает пониженной активностью белка CID14, CsD14 или CmD14 по сравнению с соответствующей растительной клеткой дикого типа, в результате чего белок CID14, CsD14 или CmD14 растительной клетки дикого типа кодируется молекулами нуклеиновой кислоты, выбранными из группы, состоящей из:

- a) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белок с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 2 (арбуз CID14), SEQ ID NO: 8 (огурец CsD14) или SEQ ID NO: 9 (дыня CmD14);
- b) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белок, последовательность которых имеет идентичность, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 2 (арбуз CID14), SEQ ID NO: 8 (огурец CsD14) или SEQ ID NO: 9 (дыня CmD14);
- c) молекулы нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 или с SEQ ID NO: 6 и кодирующей белок CID14;
- d) молекулы нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 15 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17 или с SEQ ID NO: 15 и кодирующей белок CsD14;
- e) молекулы нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 16 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18 или с SEQ ID NO: 16 и кодирующей белок CmD14.

Понижение активности белка CID14, CsD14 или CmD14 вызвано мутантным аллелем CID14, CsD14 или CmD14.

Понижение активности может быть вызвано нокдауном или нокаутом экспрессии мутантного аллеля (например, посредством мутации в промоторе или другой регуляторной последовательности) или мутантным аллелем, кодирующим белок CID14, CsD14 или CmD14 с потерей функции или пониженной функцией. Наличие мутантного аллеля, кодирующего белок с потерей функции или нокаутного аллеля в гомозиготной форме приводит к тому, что растение будет иметь фенотип с сильным множественным ветвлением, тогда как наличие мутантного аллеля, кодирующего белок с пониженной функцией, или нокдаун-аллеля в гомозиготной форме приведет к фенотипу с промежуточным множественным ветвлением, между растением, которое является гомозиготным по аллелю дикого типа, и растением, которое является гомозиготным по (нокаутному) аллелю с потерей функции.

В одном аспекте мутантный аллель CID14, CsD14 или CmD14 кодирует мутантный белок CID14, CsD14 или CmD14, имеющий пониженную функцию или с потерей функции по сравнению с белком дикого типа, например, мутантный белок содержит одну или более замененных, удаленных и/или вставленных или дублированных аминокислот по сравнению с белком дикого типа. В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает одну или более аминокислот, замененных, удаленных или вставленных по отношению к белку дикого типа SEQ ID NO: 2, 8 или 9, причем мутантный белок либо теряет функцию и приводит к сильному множественному ветвлению (в гомозиготной форме), либо имеет пониженную функцию и приводит к промежуточному множественному ветвлению (в гомозиготной форме).

Мутантные аллели, наличие которых приводит к усечению белков D14, обычно приводят к потере функции, как, например, мутант W155*, который в настоящем документе получен в арбузе. Кроме того, Q255* может привести к потере или понижению функции, поскольку в белке отсутствуют последние 13 аминокислот, включая 5 аминокислот высококонсервативного домена IPR000073.

Аллели, кодирующие усеченные белки или белки, содержащие одну или более аминокислот, замененных другой аминокислотой, удаленных или

вставленных, можно легко создать и протестировать в условиях *in vivo*, чтобы увидеть их влияние на множественное ветвление, если аллели находятся в гомозиготной форме. Мутанты, описанные в таблице 2 и таблице А ниже, также легко можно получить в арбузе, дыне или огурце, или же другие мутанты можно получить с использованием известных методов, таких как случайный мутагенез с последующим, например, метод TILLING, методы целевого мутагенеза и т.д.

Также такие программы, как анализ SIFT или PROVEAN, можно использовать для прогнозирования влияния вставок, удалений или замен аминокислот на функцию белка, хотя это всего лишь прогноз, который так или иначе требует подтверждения в условиях *in vivo*. Например, согласно прогнозам SIFT-анализа, P245L является «непереносимым», а согласно анализу Provean «вредным», что означает, что функция белка согласно прогнозам будет потеряна или понижена. Для обеспечения изменений, которые прогнозируются как «терпимые» согласно SIFT или «нейтральные» согласно Provean, прогноз относительно функции состоит в том, что она не изменится. Однако, как уже упоминалось, прогноз не обязательно должен быть верным (он основан на статистических моделях), и необходим анализ в условиях *in vivo*. Тем не менее, эти инструменты могут быть полезны для дальнейшего анализа мутантных аллелей, которые согласно прогнозам будут влиять на функцию белка.

Таблица А

Мутация в SEQ ID NO: 2 (белок D14 арбуза), SEQ ID NO: 8 (белок D14 огурца) или SEQ ID NO: 9 (белок D14 дыни)	SIFT //sift.bii.a-star.edu.sg/	PROVEAN //provean.jcvi.org/
V14I	переносимый	нейтральный
P44S	переносимый	нейтральный
L72F	непереносимый	нейтральный
H89Y	переносимый	нейтральный
G121S	переносимый	нейтральный
S139N	переносимый	нейтральный

(в ID NO: 8 это уже N)		
W155Stop	непереносимый	вредный
G235V	переносимый	вредный
P254L	непереносимый	вредный
Q255Stop	непереносимый	вредный

Таким образом, одним из аспектов настоящего изобретения является растение арбуза, содержащее мутантный аллель гена *CID14* (*Citrullus lanatus Dwarf14*), причем мутантный аллель включает в себя мутацию в одной или более регуляторных последовательностях, приводящую к снижению экспрессии гена или отсутствию экспрессии гена по сравнению с соответствующим аллелем дикого типа, или причем мутантный аллель кодирует белок, содержащий делецию, усечение, вставку или замену одной или более аминокислот по сравнению с белком, кодируемым аллелем дикого типа, что приводит к снижению или потере функции белка *CID14*, причем наличие мутантного аллеля приводит к развитию у указанного растения увеличенного среднего количества вторичных ветвей, если мутантный аллель находится в гомозиготной форме, и причем мутантный аллель не является мутантным аллелем, кодирующим белок SEQ ID NO: 1,

причем белок *CID 14* аллеля дикого типа кодируется молекулами нуклеиновой кислоты, выбранными из группы, состоящей из:

- a) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белок с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 2;
- b) молекул нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеотидную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 6, или ее комплементарную последовательность.

Другим аспектом настоящего изобретения является растение огурца, содержащее мутантный аллель гена под названием *CsD14* (*Cucumis sativus Dwarf14*), причем мутантный аллель включает мутацию в одной или более регуляторных последовательностях, приводящую к снижению или отсутствию экспрессии гена по сравнению с соответствующим аллелем дикого типа, или причем мутантный аллель кодирует белок, содержащий удаление, усечение,

вставку или замену одной или более аминокислот по сравнению с белком, кодируемым аллелем дикого типа, что приводит к снижению или потере функции белка *CsD14*, причем наличие мутантного аллеля приводит к развитию у указанного растения увеличенного среднего количества вторичных ветвей, если мутантный аллель находится в гомозиготной форме,

причем белок *CsD14* аллеля дикого типа кодируется молекулами нуклеиновой кислоты, выбранными из группы, состоящей из:

- a) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белок с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 8;
- b) молекул нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеотидную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 15, или ее комплементарную последовательность.

Другим аспектом настоящего изобретения является растение огурца, содержащее мутантный аллель гена под названием *CmD14* (*Cucumis melo Dwarf14*), причем мутантный аллель включает мутацию в одной или более регуляторных последовательностях, приводящую к снижению или отсутствию экспрессии гена по сравнению с соответствующим аллелем дикого типа, или причем мутантный аллель кодирует белок, содержащий удаление, усечение, вставку или замену одной или более аминокислот по сравнению с белком, кодируемым аллелем дикого типа, что приводит к снижению или потере функции белка *CmD14*, причем наличие мутантного аллеля приводит к развитию у указанного растения увеличенного среднего количества вторичных ветвей, если мутантный аллель находится в гомозиготной форме,

причем белок *CmD14* аллеля дикого типа кодируется молекулами нуклеиновой кислоты, выбранными из группы, состоящей из:

- a) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белок с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 9;
- b) молекул нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеотидную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 16, или ее комплементарную последовательность.

В частности, растение арбуза, растение огурца или растение дыни, содержащее мутантный аллель, кодирующий белок, в котором одна или несколько

аминокислот вставлены, заменены или удалены, причем указанный мутантный белок имеет пониженную функцию, но функция белка не утрачена, в результате чего среднее количество вторичных ветвей больше, чем у растения, являющегося гомозиготным по аллелю *D14* дикого типа, но не настолько велико, как у растения, являющегося гомозиготным по мутантному аллелю *D14*, кодирующему нефункциональный белок.

Также в одном аспекте растение арбуза, растение огурца или растение дыни содержит мутантный аллель, кодирующий белок, в котором одна или несколько аминокислот вставлены, заменены или удалены, причем в указанном мутантном белке имеет место потеря функции.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает V14 последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9 замещен другой аминокислотой, особенно I, или стоп-кодоном.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает P44 последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9 замещен другой аминокислотой, особенно S, или стоп-кодоном.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает L72 последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9 замещен другой аминокислотой, особенно F, или стоп-кодоном.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает H89 последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9 замещен другой аминокислотой, особенно Y, или стоп-кодоном.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает G121 последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9 замещен другой аминокислотой, особенно S, или стоп-кодоном.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает S139 последовательности SEQ ID NO: 2 или 9 замещен другой аминокислотой, особенно N, или стоп-кодоном.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает W155 последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9 замещен другой аминокислотой, особенно или стоп-кодоном.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает G235 последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9 замещен другой аминокислотой, особенно V, или стоп-кодоном.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает P254 последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9 замещен другой аминокислотой, особенно L, или стоп-кодоном.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает Q255 последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9 замещен другой аминокислотой, особенно или стоп-кодоном.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает дубликацию, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все 8 аминокислот, выбранных из аминокислот от 94 до 101 SEQ ID NO: 2, 8 или 9. В одном аспекте, в меньшей мере, S97 дублируется. В одном аспекте аминокислоты с 94 по 101 дублируются.

В другом аспекте мутантный аллель кодирует белок, который содержит удаление или замену, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или всех 8 аминокислот, выбранных из аминокислот от 94 до 101 SEQ ID NO: 2, 8 или 9. В одном аспекте, по меньшей мере, S97 удаляется или заменяется другой аминокислотой. В одном аспекте аминокислоты от 94 до 101 удалены или заменены другими аминокислотами.

Таким образом, в одном аспекте мутантный аллель кодирует белок CID14, CsD14, CmD14 последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9 соответственно, в котором, по меньшей мере, S97 дублирована, или в котором дублируются, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или все 8 последовательных аминокислот из состава следующих аминокислот: V94 (валин 94), G95 (глицин 95), H96 (гистидин 96), S97 (серин 97), V98 (валин 98), S99 (серин 99), A100 (аланин 100), M101 (метионин 101). В одном аспекте, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4 или более последовательных аминокислот включают S97.

В одном аспекте дубликация, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4 или более аминокислот расположена рядом с исходными аминокислотами, т.е. без промежутка других аминокислот между дублированными аминокислотами.

В другом аспекте мутантный аллель кодирует белок CID14, CsD14, CmD14 с SEQ ID NO: 2, 8 или 9, соответственно, в котором, по меньшей мере, одна

аминокислота, например, по меньшей мере, одна аминокислота, выбранная из аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2, 8 или 9, или, по меньшей мере, одна аминокислота в домене IPR000073 SEQ ID NO: 2, 8 или 9, или, по меньшей мере, одна аминокислота домена спиральной крышки заменена другой аминокислотой или стоп-кодоном, что приводит к потере или снижению функции белка и изменению фенотипа (увеличению вторичного ветвления), если аллель находится в гомозиготной форме (когда в диплоидном растении или растительной клетке нет аллеля дикого типа). Домен IPR000073 начинается с аминокислоты 22 SEQ ID NO: 2, 8 и 9 и заканчивается аминокислотой 259 SEQ ID NO: 2, 8 и 9. Домен спиральной крышки начинается с аминокислоты 136 SEQ ID NO: 2, 8 и 9 и заканчивается аминокислотой 193 SEQ ID NO: 2, 8 и 9. Когда речь идет о начале или конце, включается упомянутая аминокислота или нуклеотид.

В еще одном аспекте мутантный аллель кодирует белок CID14, CsD14, CmD14 с SEQ ID NO: 2, 8 или 9 соответственно, в котором, по меньшей мере, одна аминокислота каталитической триады или же предшествующая или следующая за аминокислотой каталитической триады через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 позиций, заменяется другой аминокислотой или стоп-кодоном, что приводит к потере или понижению функции белка и изменению фенотипа (увеличению вторичного ветвления), если аллель находится в гомозиготной форме (когда в диплоидном растении или растительной клетке нет аллеля дикого типа). Аминокислотами каталитической триады являются S97, D218 и H247 SEQ ID NO: 2, 8 или 9.

В другом аспекте отсутствует одна или несколько аминокислот, например, в результате мутации, вызывающие преждевременное образование стоп-кодона, что приводит к потере или снижению функции белка и изменениям фенотипа (увеличению вторичного ветвления), если аллель находится в гомозиготной форме (когда в диплоидном растении или клетке растения отсутствует аллель дикого типа). В частности, в одном аспекте одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2, 8 или 9, отсутствуют, например, из-за преждевременной мутации стоп-кодона, присутствующей в последовательности перед кодоном(-ами), кодирующим указанную аминокислоту(ы). Отсутствует одна или несколько аминокислот домена IPR000073, либо отсутствует одна или несколько аминокислот домена спиральной крышки либо одна или несколько аминокислот каталитической триады, и/или предшествующая или следующая

аминокислота каталитической триады через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 позиций, например, из-за преждевременной мутации стоп-кодона, присутствующей в последовательности перед кодоном(-ами), кодирующим указанную аминокислоту(ы).

Снижение или потеря функции белка наблюдается, когда мутантный аллель изменяет фенотип в условиях *in vivo* по сравнению с фенотипом дикого типа, т.е. нормальное вторичное ветвление, когда аллель дикого типа присутствует в гомозиготной форме, изменяется на повышенное вторичное ветвление, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме у диплоидного растения. Таким образом, термин «повышенное вторичное ветвление» или «увеличенное среднее количество вторичных ветвей» охватывает как фенотип «полного множественного ветвления», вызванный потерей функции белка D14 или нокаутом экспрессии аллеля D14, так и фенотип «промежуточного множественного ветвления», вызванный белком D14 с пониженной функцией или пониженной экспрессией аллеля D14 по сравнению с функциональным аллелем D14 дикого типа. Абсолютное среднее количество вторичных ветвей может несколько различаться для разных генотипов, но относительный эффект для разных генотипов должен быть одинаковым. Таким образом, при определенном генетическом фоне или генотипе у дикого типа имеется определенное среднее количество вторичных ветвей, белок с потерей функции или нокаутный аллель имеют максимальное или «полное» среднее количество вторичных ветвей, а аллель с пониженной функцией или нокаун-аллель находятся между этими двумя крайними состояниями. Например, если среднее количество вторичных ветвей в диком типе установлено равным 100%, а потеря функции составляет 240% по сравнению с диким типом, то среднее значение вторичного ветвления выше 100% и ниже 240% представляет собой фенотипы с «промежуточным множественным ветвлением». В одном аспекте, «повышенное среднее вторичное ветвление» составляет не менее 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210% относительно дикого типа (при котором это 100%). В другом аспекте «повышенное среднее вторичное ветвление» ниже, чем «полное множественное ветвление», и оно составляет, например, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 70% или менее, 60% или менее, 50% или менее от «полного множественного ветвления» (при котором это 100%).

В одном аспекте повышенное вторичное ветвление представляет собой среднее количество вторичных ветвей, равное или превышающее 45, что видно в растении арбуза, которое является гомозиготным по аллелю, кодирующему белок SEQ ID NO: 1 (включающий дубликацию аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO:2), по сравнению с растением арбуза, которое является гомозиготным по белку, кодирующему аллель дикого типа SEQ ID NO: 2, которое дает в среднем около 20 вторичных ветвей. См. также раздел Примеры.

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, например, с 90 см от кончика/бокового побега основного стебля до кончика/бокового побега. Таким образом, вторичное ветвление в одном аспекте измеряется путем подсчета количества вторичных ветвей, начиная на расстоянии 90 см от кроны до кончика/кроны растения. Это выполняется для нескольких (не менее 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) растений линии, после чего подсчитывают среднее количество вторичных ветвей для каждой линии. Однако вторичное ветвление можно также измерить подсчетом количества вторичных ветвей, начинающихся на более коротком расстоянии от кроны, например, 40 см.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Культивируемое растение арбуза, огурца или дыни или часть растения содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, известного как *CID14* в арбузе, *CsD14* в огурце или *CmD14* в дыне, причем указанный мутантный аллель дает среднее повышенное количество вторичных ветвей, если мутантный аллель находится в гомозиготной форме у диплоидного растения.

В одном аспекте ген *CID14* арбуза расположен на 8-й хромосоме генома арбуза, особенно этот ген расположен в участке, начинающемся с основания 28794281 и заканчивающемся основанием 28795173 8-й хромосомы генома Чарльстона Грея (cucurbitgenomics.org). Последовательность промотора расположена выше геномной кодирующей последовательности, например, на расстоянии 1000 или 2000 оснований выше основания 28794281.

В одном аспекте мутантный аллель *CID14*, *CsD14* или *CmD14* в гомозиготной форме обеспечивает полное множественное ветвление, которое представляет собой образование наибольшего среднего количества вторичных ветвей из-за того, что кодируемый мутантный белок является нефункциональным или из-за того, что мутантный аллель не экспрессируется, т.е. представляет собой нокаутный аллель.

В другом аспекте мутантный аллель *CID14*, *CsD14* или *CmD14* в гомозиготной форме обеспечивает промежуточное множественное ветвление, которое представляет собой образование увеличенного среднего количества вторичных ветвей по сравнению с растением дикого типа, но не самое большое среднее количество ветвей, способных образоваться у растения с полным множественным ветвлением. Промежуточное множественное ветвление происходит из-за того, что кодируемый мутантный белок имеет пониженную функцию по сравнению с белком дикого типа, или же из-за того, что мутантный аллель экспрессируется на более низком уровне по сравнению с аллелем дикого типа, т.е. является нокдаун-аллелем.

В одном из вариантов осуществления растение или часть растения или семя, содержащее мутантный аллель гена *CID14*, представляет собой растение или часть растения или семя арбуза, и при этом является диплоидным, тетраплоидным, триплоидным или полиплоидным. Предпочтительно мутантный аллель присутствует в одной или двух копиях в диплоидном растении, части растения или семени. При необходимости, он может присутствовать в двух или 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.

Растение, часть растения или семя могут быть растением, частью растения или семенем арбуза, с содержанием, по меньшей мере, одной копии мутантного аллеля гена *CID14*, при этом ген дикого типа кодирует белок дикого типа с SEQ ID NO: 2 (или белок дикого типа, содержащий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97% или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2), или может представлять собой огурец, содержащий, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена под названием *CsD14*, при этом ген дикого типа кодирует белок дикого типа с SEQ ID NO: 8 (или белок дикого типа, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97% или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8), или может представлять

собой дыню, содержащую, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена под названием CmD14, при этом ген дикого типа кодирует белок дикого типа с SEQ ID NO: 9 (или белок дикого типа, содержащий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97% или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9).

Часть растения, содержащая мутантный аллель гена CID14, CsD14 или CmD14, может быть клеткой, цветком, листом, стеблем, черенком, пыльцой, корнем, подвоем, привоем, плодом, протопластом, зародышем, пыльником.

Также объектом изобретения является вегетативно размножающееся растение арбуза, огурца или дыни, размноженное из такой части растения, содержащей, по меньшей мере, один мутантный аллель гена CID14, CsD14 или CmD14.

Аналогичным образом изобретением предусмотрено семя, из которого можно вырастить растение по настоящему изобретению.

Кроме того, предусмотрены мужские или женские цветки, завязи, пыльники и пыльца или микроспоры, производимые растением согласно изобретению.

Предусмотрен способ получения плодов арбуза, огурца или дыни, причем указанный способ включает выращивание диплоидного растения, содержащего одну или две копии мутантного аллеля гена CID14, CsD14 или CmD14. Мутантные аллели описаны в других разделах настоящего документа и представляют собой аллели D14, которые в гомозиготной форме обеспечивают повышенное вторичное ветвление (гомозиготное для мутантного аллеля) по сравнению с нормальным вторичным ветвлением (гомозиготное для аллеля D14 дикого типа).

Предусмотрен способ получения бессемянных плодов арбуза, причем указанный способ включает выращивание триплоидного растения и диплоидного растения-опылителя, причем растение-опылитель содержит две копии мутантного аллеля гена CID14, что позволяет опылять цветки триплоидного растения и, при необходимости, сбор бессемянных триплоидных плодов.

Предусмотрен способ получения бессемянных плодов арбуза, причем указанный способ включает выращивание триплоидного растения и диплоидного растения-опылителя, причем триплоидное растение содержит одну, две или три копии мутантного аллеля гена CID14, что позволяет опылять цветки триплоидного растения и, при необходимости, сбор бессемянных триплоидных плодов.

Предусмотрен еще один способ получения плодов арбуза с семенами, причем указанный способ включает выращивание диплоидного растения, которое содержит одну или две копии мутантного аллеля гена *CID14*, что позволяет опылять цветы и, при необходимости, собирать диплоидные плоды с семенами.

Предусмотрен способ выращивания растений арбуза, огурца или дыни, включающий выращивание диплоидного растения арбуза, огурца или дыни, содержащего одну или две копии мутантного аллеля гена *CID14*, *CsD14* или *CmD14*, особенно в поле или в теплице или туннеле.

Предусмотрен способ получения культурного растения арбуза, огурца или дыни, обеспечивающее (среднее) увеличенное количество вторичных ветвей (по сравнению с растением, гомозиготным по гену *D14* дикого типа), включающий следующие этапы:

- a) введение случайных или целенаправленных мутаций в одно или несколько растений, частей растений или семян арбуза, огурца или дыни; или обеспечение популяции мутантных растений или семян (например, TILLING-популяции),
- b) селекцию растения, которое содержит мутантный аллель гена *CID14*, *CsD14* или *CmD14*, например, мутантный аллель, который производит значительно меньшее количество белка дикого типа *CID14*, *CsD14* или *CmD14* (например, нокдаун-аллеля или нокаутного аллеля) или который кодирует белок, содержащий одну или более аминокислот, удаленных, замененных, вставленных или дублированных по сравнению с белком дикого типа,
- c) при необходимости, удаление любой трансгенной конструкции (например, системы CRISPR) из растения, и/или
- d) при необходимости, получение растения, гомозиготного по мутантному аллелю, и анализ среднего количества вторичных ветвей, образующихся у растения, по сравнению с растением, гомозиготным по аллелю дикого типа.

Предусмотрен способ селекции или идентификации растений, семян или частей растений арбуза, огурца или дыни, включающий следующие этапы:

- a) анализ того, содержит ли геномная ДНК растения или часть растения мутантный аллель и/или содержит ли аллель дикого типа ген *CID 14*, *CsD14* или *CmD14* в своем геноме и, при необходимости,
- b) селекцию растения или части растения, содержащего одну или две копии мутантного аллеля гена *CID 14*, *CsD14* или *CmD14* в своем геноме,

причем аллель дикого типа гена *CID14* кодирует белок SEQ ID NO: 2, аллель дикого типа гена *Cs14* кодирует белок SEQ ID NO: 8, а аллель дикого типа гена *CmD14* кодирует белок SEQ ID NO: 9.

Этап а) может выполняться различными способами, например, с использованием методов, основанных на ПЦР, секвенировании, гибридизации нуклеиновых кислот, уровнях экспрессии генов и т.д. В одном аспекте, например, можно использовать анализ аллель-специфической ПЦР, см., например, раздел Примеры.

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

- a) предоставление образца (или множества образцов) геномной ДНК растения арбуза, дыни или огурца или множества растений (например, популяции F2, инбредных линий, популяции обратного скрещивания, селекционной популяции, гибридных растений и т.д.),
- b) предоставление пары праймеров для ПЦР или олигонуклеотидного зонда, 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 D14 гена *CID14*, *CsD14* или *CmD14* и могут гибридизироваться 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 *CID14*, *CsD14* или *CmD14* в геноме,

причем аллель дикого типа гена *CID14* кодирует белок SEQ ID NO: 2, аллель дикого типа гена *Cs14* кодирует белок SEQ ID NO: 8, а аллель дикого типа гена *CmD14* кодирует белок SEQ ID NO: 9.

На этапе b) пара праймеров ПЦР представляет собой, по меньшей мере, один прямой праймер, дополняющий одну из цепей ДНК аллеля D14, и один обратный праймер, дополняющий другую цепь ДНК аллеля D14, причем эта пара праймеров гибридизируется с денатурированной геномной ДНК и амплифицирует часть аллеля D14 в реакции ПЦР. Праймеры могут разрабатываться для амплификации аллеля дикого типа или любого мутантного аллеля D14 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 D14, 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 аспекте анализ на этапе c) представляет собой анализ аллель-специфической ПЦР, 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 мутантные аллели гена D14 и аллель дикого типа, например аллель *CID14* дикого типа с SEQ ID NO: 6 и мутантным аллелем *CID14ins* SEQ ID NO: 5 или другим мутантным аллелем. Примеры других мутантных аллелей приведены в таблице A и таблице 2, но также включены любые другие мутантные аллели, например, любой мутантный аллель, который в гомозиготной форме значительно увеличивает среднее количество развивающихся вторичных ветвей по сравнению с контрольным растением, например, растение, содержащее аллель дикого типа в гомозиготной форме. В одном аспекте мутантный аллель представляет собой это нокаутный аллель или мутантный аллель, кодирующий белок с потерей функции, приводящий к сильному множественному ветвлению и, в другом аспекте мутантный аллель представляет собой нокдаун-аллель или мутантный аллель, кодирующий белок с пониженной

функцией, приводящий к промежуточному множественному ветвлению. Таким образом, в этом анализе можно обнаружить любой аллель дикого типа и/или мутантный аллель гена D14.

Для анализа геномной ДНК может потребоваться, по меньшей мере, экстракция необработанной 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 анализе аллель-специфической ПЦР.

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 или дублированных аминокислот по сравнению с белком дикого типа.

В одном аспекте мутантный аллель представляет собой аллель, кодирующую белок, содержащий одну или более аминокислот, замененных, вставленных или удаленных по отношению к функциональным белкам SEQ ID NO: 2, 8 или 9, причем мутантный белок имеет пониженную функцию или не имеет функции в условиях *in vivo*.

В одном аспекте мутантный аллель представляет собой аллель, кодирующую белок, содержащий одну или более замененных, вставленных или удаленных аминокислот, выбранных из: любой одной или более аминокислот

консервативного домена IPR00073 и/или любой одной или более аминокислот домена спиральной крышки, и/или любую одну или более аминокислот каталитической триады, и/или любую одну или более аминокислот из 8 аминокислот, предшествующих или следующих за аминокислотой каталитической триады, по отношению к функциональным белкам SEQ ID NO: 2, 8 или 9, причем мутантный белок имеет пониженную функцию или не имеет функции в условиях *in vivo*. Таким образом, в настоящий документ включены не только растения и части растения, содержащие один или несколько описанных в настоящем документе мутантных аллелей, но также и анализы, которые позволяют обнаружить растение или часть растения, содержащее, по меньшей мере, один из описанных в настоящем документе мутантных аллелей. Таким образом, любое растение арбуза, огурца или дыни, семя или часть растения или ДНК из них можно проанализировать на наличие аллеля D14 дикого типа или на наличие, по меньшей мере, одного из любых мутантных аллелей D14, описанных в настоящем документе. Для любого мутантного аллеля можно легко разработать анализ, поскольку хорошо известно, как приготовить праймеры или зонды для конкретного мутантного аллеля. Например, для аллеля W155* можно легко разработать анализ для обнаружения присутствия аллеля в геномной ДНК, полученной из растения арбуза.

В одном аспекте мутантный аллель представляет собой аллель, кодирующий белок, содержащий дупликацию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2, 8 или 9. В одном аспекте мутантный аллель включает дупликацию, по меньшей мере, Ser 97 SEQ ID NO: 2, 8 или 9. В одном аспекте мутантный аллель включает дупликацию всех аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2, 8 или 9.

В одном аспекте растение или часть растения представляет собой арбуз, а мутантный аллель кодирует белок SEQ ID NO: 1 (D14*ins*). Этот мутантный аллель, который кодирует описанную в настоящем документе дупликацию из 8 аминокислот, можно обнаружить с использованием процедуры, описанной в настоящем документе.

В другом аспекте растение или часть растения представляет собой арбуз, а мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий одну или более вставленных, замененных или удаленных аминокислот, что приводит к понижению или потере функции, но при этом он не является белком SEQ ID NO: 1 (D14*ins*), т. е.

не является аллелем, присутствующим в сорте Sidekick. Следовательно, растение не содержит последовательности SEQ ID NO: 5 в своем геноме. В одном аспекте растение содержит только одну копию последовательности SEQ ID NO: 5 в своем геноме.

Кроме того, предусмотрены способы создания и/или селекции растений или частей растений, содержащих в своем геноме, по меньшей мере, один мутантный аллель гена *CID14* арбуза, или гена *CsD14* огурца, или гена *CmD14* дыни.

В одном аспекте также предусмотрен способ обнаружения присутствия в геноме аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена *CID14* арбуза, или гена *CsD14* огурца, или гена *CmD14* дыни.

В одном аспекте предусмотрен способ определения того, содержит ли растение или часть растения, или семя арбуза, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа, кодирующего белок SEQ ID NO: 2, и/или содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля, кодирующего, например, белок SEQ ID NO: 1, или любой белок, содержащий одну или более аминокислот, замененных, вставленных или удаленных по отношению к белку SEQ ID NO: 2 (как описано в других частях), и, при необходимости, для селекции растения, части растения или семени, содержащих, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля, причем указанный мутантный аллель кодирует, например, белок SEQ ID NO: 1, или любой белок, содержащий одну или более аминокислот, замененных, вставленных или удаленных по отношению к белку SEQ ID NO: 2 (как описано в другом месте).

В другом аспекте предусмотрен способ определения того, содержит ли растение или часть растения, или семя арбуза, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа, включающего SEQ ID NO: 6, и/или содержат ли они, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля, содержащего один или несколько вставленных, замененных или удаленных нуклеотидов по отношению к SEQ ID NO: 6, при этом кодируемый белок имеет пониженную функцию или в нем имеет место потеря функции в условиях *in vivo*.

В одном аспекте предусмотрено способ обнаружения и, при необходимости, селекции растения, семени или части растения арбуза, содержащего, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена *CID14* (*Citrullus lanatus* Dwarf14), включающий следующие этапы:

- a) предоставление одного или более образцов геномной ДНК одного или более растений, семян или частей растения арбуза,
- b) проведение генотипирования с использованием образцов ДНК с этапа а) в качестве шаблона, позволяющего различать аллель *CID14* дикого типа и мутантный аллель *CID14*, причем указанный анализ генотипирования основан на амплификации нуклеиновой кислоты с использованием *CID14*-аллель-специфичных олигонуклеотидных праймеров, и/или тем, что указанный анализ генотипирования основан на гибридизации нуклеиновых кислот с использованием *CID14*-аллель-специфичных олигонуклеотидных зондов, и, при необходимости,
- c) селекцию растения, семени или части растения, содержащего одну или две копии мутантного аллеля,

причем мутантный аллель *CID14* содержит один или более нуклеотидов, вставленных, дублированных, удаленных или замененных относительно последовательности SEQ ID NO: 6, что приводит к образованию мутантного белка *CID14*, который содержит одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, удаленных или замененных относительно последовательности SEQ ID NO: 2.

В приведенном выше методе указанные *CID14*-аллель-специфичные олигонуклеотидные праймеры или указанные *CID14*-аллель-специфичные олигонуклеотидные зонды представляют собой праймер или зонд, содержащий, по меньшей мере, 10 нуклеотидов с SEQ ID NO: 6 или комплементарную цепь с SEQ ID NO: 6.

В этом способе в одном аспекте мутантный аллель содержит, 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. Например, мутантный аллель представляет собой мутантный аллель согласно описанию в Таблице А или Таблице 2 настоящего документа. Мутантный аллель может представлять собой аллель, который кодирует мутантный белок D14, и в котором имеет место потеря или понижение функции, что приводит к сильному множественному ветвлению или, соответственно, промежуточному

множественному ветвлению, если мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

Также анализ аллель-специфической ПЦР (конкурентный аллель-специфический анализ ПЦР-генотипирования Kbioscience), включающий два аллель-специфичных прямых праймера, например, праймер FAM SEQ ID NO: 10, и праймер VIC SEQ ID NO: 11, а также общий обратный праймер, например, SEQ ID NO: 12. Также см. Примеры. Очевидно, что могут быть разработаны другие аллель-специфические праймеры для обнаружения и/или различения между аллелем дикого типа (кодирующим белок SEQ ID NO: 2) и мутантным аллелем, содержащим дупликацию 24 нуклеотидов (кодирующим 8 аминокислот) и кодирующим белок SEQ ID NO: 1, или любой другой мутантный аллель, содержащий, например, одну или более аминокислот, замененных, дублированных, удаленных или вставленных по отношению к белку дикого типа. Например, предусмотрен анализ аллель-специфической ПЦР для обнаружения мутантного аллеля, в котором кодон W155 заменен на стоп-кодон, или анализ аллель-специфической ПЦР для любого из мутантных аллелей из таблицы 2, а также любого другого мутантного аллеля, который приводит к появлению белка D14 с потерянной или пониженной функцией в условиях *in vivo*.

Аналогичным образом, настоящим документом рассматриваются выделенные последовательности или молекулы геномной последовательности (дикого типа или мутантной), последовательность кДНК или мРНК, белковые последовательности, а также олигонуклеотидные праймеры или зонды для обнаружения аллеля дикого типа или мутантного аллеля гена CID14 арбуза или гена *CsD14* огурца или гена *CmD14* дыни.

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

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

- b) предоставление, по меньшей мере, пары праймеров для ПЦР или, по меньшей мере, олигонуклеотидного зонда, причем праймеры или (олигонуклеотидный) зонд содержит, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или более последовательных нуклеотидов геномного аллеля D14 гена *CID14*, *CsD14* или *CmD14* и могут гибридизироваться 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 *CID14*, *CsD14* или *CmD14* в геноме,

причем аллель дикого типа гена *CID14* кодирует белок SEQ ID NO: 2 (или содержит геномную ДНК SEQ ID NO: 6), аллель дикого типа гена *Cs14* кодирует белок SEQ ID NO: 8 (или содержит геномную ДНК SEQ ID NO: 15) и аллель дикого типа гена *CmD14* кодирует белок SEQ ID NO: 9 (или содержит геномную ДНК SEQ ID NO: 16).

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

- a) предоставление образца (или множества образцов) геномной ДНК растения арбуза, дыни или огурца или множества растений (например, популяции F2, инбредных линий, популяции обратного скрещивания, селекционной популяции, гибридных растений и т.д.),
- b) предоставление, по меньшей мере, пары праймеров для ПЦР или, по меньшей мере, 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 D14 гена *CID14*, *CsD14* или *CmD14* и

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

- с) проведение ПЦР-анализа с использованием пары праймеров или анализа гибридизации с использованием зонда согласно этапу b) на образце(ах) этапа а) 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 *CID14*, *CsD14* или *CmD14* в геноме,

причем аллель дикого типа гена *CID14* кодирует белок SEQ ID NO: 2 (или содержит геномную ДНК SEQ ID NO: 6), аллель дикого типа гена *Cs14* кодирует белок SEQ ID NO: 8 (или содержит геномную ДНК SEQ ID NO: 15) и аллель дикого типа гена *CmD14* кодирует белок SEQ ID NO: 9 (или содержит геномную ДНК SEQ ID NO: 16).

Также предусмотрен набор для генотипирования, включающий праймеры и/или зонды и реакционные компоненты для амплификации и/или гибридизации части геномной ДНК гена *D14*.

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

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 крайней 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 микрклональное 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 более альтернативных форм гена в конкретном локусе, например локус D14 (где расположен ген D14; аллели гена могут быть аллелями дикого типа, обозначенными *CID14* (в арбузе) или *CsD14* (в огурце) или *CmD14* (в дыне) или мутантными аллелями, при этом все указанные аллели относятся к одному признаку или характеристике в определенном локусе (например, вторичное ветвление). 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 или одна копия мутантного аллеля и одна копия аллеля дикого типа. Аналогичным образом, триплоидное растение считается

гомозиготным по данному гену, если оно имеет три идентичных аллеля гена (например, три копии мутантного аллеля, а тетраплоидное растение считается гомозиготным по этому гену, если оно имеет четыре идентичных аллеля гена, например, четыре копии мутантного аллеля).

«Ген *CID14*» представляет собой одиночный рецессивный ген, идентифицированный у культивируемого арбуза на хромосоме 8, мутация которого приводит к изменению фенотипа с увеличенным (средним) количеством вторичных ветвей, формирующихся, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме, по сравнению с растением, гомозиготным по немутированному гену *CID14* дикого типа. Ген *CsD14* и ген *CmD14* являются ортологами гена *CID14*, но затем они появляются у огурца и дыни.

«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 гомозиготны 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, 4, 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 *D14* 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 *CID14*» по тексту настоящей заявки обозначает мутантный аллель гена арбуза, который приводит к тому, что в растении арбуза развивается увеличенное (среднее) количество вторичных ветвей, например, 45 или более вторичных ветвей в случаях, когда мутантный аллель представлен в гомозиготной форме (также такой тип роста именуется «множественное ветвление»). Аналогичным образом, «мутантный аллель *CsD14*» или «мутантный аллель *CmD14*» относятся к мутантным аллелям ортологичных генов огурца и дыни, которые вызывают усиление вторичного ветвления у этих культур. Мутация в мутантном аллеле может представлять собой любую мутацию или комбинацию мутаций, включая делеции, усечения, вставки, дупликации, точечные мутации, бессмысленные мутации, ошибочные смысловые мутации или несинонимичные мутации, мутации сайта сплайсинга, мутации сдвига рамки считывания и/или мутации в одной или более регуляторных последовательностях, таких как последовательность промотора или последовательности энхансера или сайленсера. Наличие мутантного аллеля *CID14* может привести к «полному множественному ветвлению» или «сильному множественному ветвлению», что относится к мутантному аллелю, не передающему в растении сигнал для подавления образования вторичной ветви, из-за мутантного аллеля, кодирующего белок с потерей функции, или мутантного аллеля, который является нокаутным аллелем. Наличие мутантного аллеля *CID14* может привести к «промежуточному множественному ветвлению», что относится к мутантному аллелю, передающему некоторый сигнал в растении для подавления образования вторичных ветвей в некоторой, но значительно меньшей степени, чем у растения дикого типа, из-за мутантного аллеля, кодирующего белок с пониженной функцией или мутантного аллеля, который является нокдаун-аллелем. Таким образом, фенотип «промежуточного множественного ветвления» находится между средним

количеством вторичных ветвей растения, являющегося гомозиготным по немутантному аллелю дикого типа, и средним количеством вторичных ветвей растения, имеющего фенотип «полного множественного ветвления».

«Аллель *CID14*, или *CsD14*, или *CmD14* дикого типа» в настоящем документе относится к функциональному аллелю гена, который заставляет растение развивать нормальное количество вторичных ветвей. Аллель дикого типа *CID14* встречается у любого коммерческого сорта арбуза (например, сорта Нанхемс Премиум F1, Монреаль F1 и др.) В одном аспекте аллель дикого типа *CID14* представляет собой аллель дикого типа гена *CID14*, причем ген *CID14* представляет собой ген, кодирующий белок последовательности SEQ ID NO: 2 или кодирующий белок, содержащий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 (при парном выравнивании, например, с использованием Needle). В одном аспекте аллель дикого типа *CsD14* представляет собой аллель дикого типа гена *CsD14*, причем ген *CsD14* представляет собой ген, кодирующий белок последовательности SEQ ID NO: 8 или кодирующий белок, содержащий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8 (при парном выравнивании, например, с использованием Needle). В одном аспекте аллель дикого типа *CmD14* представляет собой аллель дикого типа гена *CmD14*, причем ген *CmD14* представляет собой ген, кодирующий белок последовательности SEQ ID NO: 9 или кодирующий белок, содержащий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9 (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 *CID14*, представляет собой место в геноме арбуза, где обнаружен мутантный аллель и/или аллель дикого типа гена *CID14*. Локус *CID14* – это локус на хромосоме 8 культивируемого арбуза (с использованием распределения хромосом опубликованного генома арбуза, доступного в сети Интернет по адресу: cucurbitgenomics.org в разделе «Арбуз: Геном», «Чарльстон Грей» или «97103 V1 или V2»).

«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 можно вырастить 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 ploidy, 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, 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 родитель используется для стимуляции завязывания плодов и формирования семян у тетраплоидного женского родителя, в результате чего получаются 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 семян. 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.

«Интерплантация» 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 подвой 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, множественное ветвление), когда в диплоидном геноме отсутствует доминантный аллель, т.е. когда он является гомозиготным в диплоидном растении. Мутантный аллель *CID14* 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).

«Культивируемый 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. За счет этого дикий арбуз исключается.

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

«Культивируемый огурец» или «культивируемая дыня» относятся к *Cucumis sativus* или *Cucumis melo*, которые обладают хорошими агротехническими характеристиками, особенно дающие товарные плоды хорошего качества и однородности. Сюда не относятся дикие огурцы и дикие дыни, которые дают неоднородные плоды низкого качества.

«Маркер ОНП» обозначает однонуклеотидный полиморфизм, например, между мутантный аллель *CID14*, *CsD14* или *CmD14* и аллель дикого типа. При

помощи маркерного анализа ОНП, который позволяет различать мутантный аллель и аллель дикого типа гена (т.е. аллель-специфического анализа) можно проверить ткани, части растений или полученную из них ДНК на наличие мутантного аллеля и/или аллеля дикого типа.

«ИДП-маркер» относится к инсерционно-делеционному полиморфизму, например, между мутантным аллелем *CID14*, *CsD14* или *CmD14* и аллелем *CID14*, *CsD14* или *CmD14* дикого типа. Например, маркер mWM23349015_k2 представляет собой ИДП-маркер, который различает аллель *CID14* дикого типа, кодирующий белок SEQ ID NO: 2, и мутантный аллель *CID14*, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 (включающий дупликацию 8 аминокислот). Используя анализ ИДП-маркера, который позволяет различать мутантный аллель гена и аллель дикого типа (т.е. аллель-специфический анализ), можно провести скрининг тканей, частей растений или полученной из них ДНК на наличие мутантного аллеля.

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.

«Геном культивируемого арбуза», «физическое положение в геноме культивируемого арбуза» и «хромосома 8» 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 *CID14*» обозначает геномную область, например, хромосому 8 культурного арбуза, область которого содержит мутантный аллель *CID14*. Наличие аллеля можно определить фенотипически и/или путем обнаружения маркеров, различающих разные аллели *CID14*, или по геномной последовательности самой последовательности аллеля (определяемой, например, путем секвенирования аллеля). «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.

Указывается, что генетический элемент, фрагмент интрогрессии или ген или аллель, придающие признак (например, фенотипические характеристики мутантного аллеля *D14*) «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 *CID14*) 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. Аналогичным образом, культивируемые огурцы или дыни, содержащие генетический элемент, локус, интрогрессионный фрагмент, ген или аллель (например, мутантный аллель *Cs D14* или *CmD14*), можно создать в условиях *de novo*.

«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, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 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. Например, когда речь идет о различиях в среднем количестве вторичных ветвей, следует понимать, что упомянутые различия являются статистически значимыми различиями, например, генотип растения с «промежуточным множественным ветвлением» имеет статистически значимо более высокое среднее количество вторичных ветвей, чем генотип контрольного растения, содержащий аллель *D14* дикого типа в гомозиготной форме.

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 8, содержащая мутантный аллель *CID14*.

«Обратное скрещивание» относится к методу разведения, при котором (одиночный) признак, такой как фенотипические изменения, привнесенные мутантным аллелем *CID14*, 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 или ИДП-маркеры), 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 *CID14*, или аллель-специфический маркер можно использовать для обнаружения и/или селекции, например, растений арбуза или частей растения, содержащих мутантный аллель *CID14*. Аллель-специфические маркеры являются предпочтительными маркерами, поскольку они осуществляют непосредственную селекцию аллеля.

«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 крайней 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 – DNASFULL, 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, 95%, 96%, 97%, 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 DNASFULL для нуклеиновых кислот и Blosum62 для белков).

При упоминании последовательности нуклеиновой кислоты (например, ДНК или геномной ДНК), имеющей «существенную идентичность» последовательности с» эталонной последовательностью или имеющей идентичность последовательности, по меньшей мере, 95%, например, по меньшей мере, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности нуклеиновой кислоты с эталонной последовательностью, в одном из вариантов осуществления

указанная нуклеотидная последовательность считается по существу идентичной данной нуклеотидной последовательности, и может быть идентифицирована с использованием 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 гибридизируется 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 более нуклеотидов по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа, например, путем замены, делеции или вставки одного или более 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 АТГ, 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, по меньшей мере, 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.

«Дупликация» означает, что один или несколько (последовательных) нуклеотидов или одна или несколько (последовательных) аминокислот присутствуют, по меньшей мере, дважды в нуклеотидной или аминокислотной последовательности вместо одного раза в последовательности дикого типа. Таким образом, дупликация представляет собой вставку одного или более последовательных нуклеотидов или одной или более последовательных аминокислот, которые уже один раз присутствовали в последовательности дикого типа. Вставка может находиться рядом с исходной последовательностью или может быть отделена одним или несколькими нуклеотидами или аминокислотами, т.е. она может дублироваться дальше от исходной последовательности.

«Преждевременный стоп-кодон» по тексту настоящего изобретения означает, что стоп-кодон присутствует в кодирующей последовательности (cds), которая находится ближе к иницирующему 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 более нуклеотидов по сравнению с последовательностью дикого типа, например, путем замены, делеции или вставки одного или более нуклеотидов, что приводит, например, к уменьшению или отсутствию транскрипта мРНК формирующегося гена.

«Мутация в белке» обозначает изменение одного или более аминокислотных остатков по сравнению с последовательностью дикого типа, например путем замены, делеции, усечения или вставки и дупликации одного или более 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 D14 по сравнению с соответствующей растительной клеткой дикого типа или соответствующим растением дикого типа. Снижение должно в одном аспекте включать полный нокаут или нокаун экспрессии гена, или возникновение отсутствующей или сниженной функции белка D14, например мутантный белок D14 мог утратить или снизить функцию по сравнению с функциональным белком дикого типа D14. Снижение активности может представлять собой снижение экспрессии гена, кодирующего белок D14 (также именуемый нокауном), или нокаут экспрессии гена, кодирующего белок D14, и/или уменьшение количества белка D14 в клетках или снижение или утрата функции в активности белка D14 в клетках. Как было обнаружено, что функция белка D14 непосредственно отражает (и вызывает) степень вторичного ветвления, белок с потерей функции (нокаутный аллель) или белок с пониженной функцией (нокаун-аллель) может определяться фенотипически, в растении, гомозиготном по мутантному аллелю, и будет наблюдаться либо в фенотипе «полного множественного ветвления», либо в фенотипе «промежуточного множественного ветвления».

В контексте настоящего изобретения термин «растительная клетка дикого типа» или «растение дикого типа» означает, что они содержат аллели дикого типа *D14*, а не мутантные аллели *D14*. Таким образом, растение дикого типа или растительная клетка дикого типа представляет собой растение или растительную клетку, содержащую полностью функциональные гены *D14*, кодирующие

полнофункциональные белки CID14, CsD14 или CmD14 (также именуемые белками дикого типа D14), например, применительно к растениям арбуза или растительным клеткам – диплоидное растение арбуза, вырабатывающее белок SEQ ID NO: 6 и/или вырабатывающее белок SEQ ID NO: 2 (или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2) и имеющий нормальный фенотип ветвления.

«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 местах настоящей заявки. Как указывалось ранее, было обнаружено, что функция белка D14 непосредственно отражает (и вызывает) степень вторичного ветвления, белок с потерей функции или белок с пониженной функцией может определяться фенотипически, в растении, гомозиготном по мутантному аллелю, и будет наблюдаться либо в фенотипе «полного множественного ветвления», либо в фенотипе «промежуточного множественного ветвления».

«Каталитическая триада» относится к 3 консервативным аминокислотам в белках CID14, CsD14 и CmD14 дикого типа, S97, D218 и H247 последовательности SEQ ID NO: 2 (CID14), SEQ ID NO: 8 (CsD14) последовательности SEQ ID NO: 9 (CmD14). «Направленное редактирование генов» обозначает методы, с помощью которых можно модифицировать эндогенные гены-мишени, например, один или несколько нуклеотидов могут быть вставлены, заменены и/или удалены, например, в промоторе или кодирующей последовательности. Например, методы на основе CRISPR, такие как редактирование генов Crispr-Cas9, редактирование генов Crispr-Cpf1 или более современные методы, известные как «редактирование оснований» или «редактированием праймеров», могут использоваться для модификации эндогенных генов-мишеней, таких как эндогенный ген CID14 дикого типа в арбузе (кодирующий белок SEQ ID NO: 2 или белок дикого типа, содержащий, по меньшей

мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2), эндогенный ген CsD14 дикого типа в огурце (кодирующий белок SEQ ID NO: 8 или белок дикого типа, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 8) и эндогенный ген CmD14 дикого типа в дыне (кодирующий белок SEQ ID NO: 9 или белок дикого типа, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9).

«Олигонуклеотиды» или «олиго» 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 по длине. 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, соответственно, блокирования, пометки 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, которые обладают различной функциональностью. Чаще всего применяются ДНК-олигонуклеотиды, но при этом также доступны и РНК-олигонуклеотиды. Длина олигонуклеотида обычно обозначается за счет добавления 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 крайней мере часть их последовательности была комплементарна последовательности, предназначенной для амплификации. Оптимальная длина праймера применительно к 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, дается только одна цепь последовательности, но в настоящем документе также предусмотрена и комплементарная цепь данной цепи. Комплементарные нуклеотиды ДНК являются А-комплементарными к Т и G-комплементарными к С. Комплементарные нуклеотиды РНК являются А-комплементарными к U и G-комплементарными к С.

ФИГУРЫ

Фигура 1: Попарное выравнивание аминокислотных последовательностей белка дикого типа (ДТ) CID14 последовательности SEQ ID NO: 2 и мутантного белка CID14*ins* с SEQ ID NO:1. Рассматриваемые 8 дублированных аминокислот выделены жирным шрифтом.

Фигура 2: Попарное выравнивание аминокислотных последовательностей белка AtD14 Arabidopsis (SEQ ID NO: 7) с белком CID14*ins* SEQ ID NO: 1. Аминокислоты каталитической триады выделены жирным шрифтом.

Фигура 3: Множественное выравнивание последовательностей белка CID14*ins* арбуза с SEQ ID NO: 1 и белка CsD14 огурца дикого типа (SEQ ID NO:8) и белка CmD14 дыни дикого типа (SEQ ID NO: 9).

Фигура 4: Попарное выравнивание геномной последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 6), кодирующей белок CID14 арбуза дикого типа с SEQ ID NO: 2, и мутантной геномной последовательности (SEQ ID NO: 5), содержащей 24 дублированных/вставленных нуклеотида и кодирующей мутантный белок SEQ ID NO: 1 (включающий дубликацию 8 аминокислот, в том числе одну из аминокислот каталитической триады, S97). Последовательность интрона выделена жирным шрифтом.

Фигура 5: График аллельной дискриминации для ИДП-маркера mWM23349015_k2 с аллелем Fam (аллель мутантной вставки) на оси X и аллелем VIC (аллель дикого типа/делеции) на оси Y.

Фигура 6: Мутанты TILLING, выявленные в белке CID14 дикого типа, показаны жирным шрифтом с подчеркиванием, а аминокислотная замена указана ниже. Аминокислоты в области квадрата представляют собой аминокислоты каталитической триады. Светло-серая полоса показывает домен спиральной крышки от аминокислот 136 до 193 (описано в Seto et al., 2019, Nature Communications 10:191). Два черных треугольника (со стрелками) показывают начало и конец консервативного домена IPR00073 (аминокислоты с 22 по 259), который представляет собой домен InterPro, известный как домен «альфа/бета-гидролазы-1» или «AB_гидролазы_1». Этот домен описывается следующим образом. Складка α/β -гидролазы является общей для ряда гидролитических ферментов, сильно различающихся филогенетическим происхождением и каталитической функцией. Ядро каждого фермента представляет собой α/β -лист (а не ствол), содержащий 8 нитей, соединенных спиралями. Считается, что ферменты произошли от общего предка, сохранив расположение каталитических остатков. Все они имеют каталитическую триаду, элементы которой держатся на петлях, которые представляют собой наиболее хорошо сохранившиеся структурные особенности складки. Остатки каталитической триады представлены в виде петель. Одним из них является нуклеофильный локоть, который представляет собой наиболее консервативную особенность складки.

Фигура 7: На фото справа мутант W155Stop TILLING (гомозиготного по аллелю W155Stop), демонстрирующий фенотип с множественным ветвлением. На фото слева азиготное растение (гомозиготное по аллелю дикого типа), в котором

функциональный белок CID14 связывает стриголактон и подавляет вторичное ветвление.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Первый вариант осуществления настоящего изобретения касается культивируемых растений арбуза, огурца или дыни, содержащих, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, который в настоящем документе обозначен как ген *D14* (CID14, CsD14 или CmD14), вызывающего (в гомозиготной форме) изменение в развитии среднего количества вторичных ветвей по сравнению с растением, гомозиготным по функциональному аллелю дикого типа данного гена.

Ген *CID14* представляет собой эндогенный ген культивируемого арбуза, мутация которого в гомозиготной форме приводит к значительному увеличению количества вторичных ветвей, производимых растением.

У арбуза с множественным ветвлением обнаружено, что обе копии эндогенного аллеля гена CID14 содержат дубликацию 24 нуклеотидов в кодирующей последовательности, что, в свою очередь, приводит к дубликации 8 аминокислот. Белок здесь называется *CID14ins* и показан в SEQ ID NO: 1. Дубликация включала одну из аминокислот каталитической триады (S97). Первоначально изобретатели предполагали, что такое дублирование может снизить функцию или привести к прекращению правильного функционирования каталитической триады в условиях *in vivo*.

D14 представляет собой сложный белок с несколькими функциями в растении и несколькими функциональными доменами в белке, включая связывание стриголактона, гидролиз, взаимодействие с различными другими белками и лигандами, конформационные изменения и передачу сигнала.

Поэтому крайне неожиданным оказался тот факт, что мутант TILLING, который продуцировал усеченный нефункциональный белок D14 (называемый белком W155*), имел тот же фенотип, что и белок, содержащий дубликацию из 8 аминокислот. Это означало, что белок, содержащий дубликацию 8 аминокислот (включая каталитическую триаду аминокислоты S97), на самом деле представлял собой белок с потерей функции, и что наблюдаемый фенотип представлял собой сильнейшее вторичное ветвление (называемое в настоящем документе «полным множественным ветвлением» или «сильным множественным ветвлением»). Это

также означало, что могут быть созданы мутантные белки, которые не демонстрируют полную потерю функции, что приводит к появлению фенотипа «промежуточного множественного ветвления», то есть сигнальный путь, посредством которого подавляется образование вторичных ветвей, все еще индуцируется и передается белком D14 с пониженной функцией, в связи с чем происходит лишь частичное подавление вторичного ветвления.

Таким образом, в одном аспекте предусмотрено растение арбуза, содержащее мутантный аллель гена *CID14* (*Citrullus lanatus Dwarf14*), причем мутантный аллель включает мутацию в одной или более регуляторных последовательностях, приводящую к снижению экспрессии гена или отсутствию экспрессии гена по сравнению с соответствующим аллелем дикого типа, или причем мутантный аллель кодирует белок, содержащий удаление, усечение, вставку или замену одной или более аминокислот по сравнению с белком, кодируемым аллелем дикого типа, что приводит к снижению или потере функции белка *CID14*, причем наличие мутантного аллеля приводит к развитию у указанного растения увеличенного среднего количества вторичных ветвей, если мутантный аллель находится в гомозиготной форме, и причем мутантный аллель не является мутантным аллелем, кодирующим белок SEQ ID NO: 1 (белок *CID14ins*),

причем белок *CID 14* аллеля дикого типа кодируется молекулами нуклеиновой кислоты, выбранными из группы, состоящей из:

- a) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белок с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 2,
- b) молекул нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеотидную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 6, или ее комплементарную последовательность.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, в котором одна или несколько аминокислот вставлены, заменены или удалены, что приводит к потере функции белка, в результате чего среднее количество вторичных ветвей находится на самом высоком уровне (полное множественное ветвление), например, по меньшей мере, 200%, 210%, 215%, 220% или более контрольного растения дикого типа, содержащего аллель дикого типа в гомозиготной форме, например, оно такое же высокое, как и в растении, гомозиготном по мутантному аллелю *CID14*,

кодирующему нефункциональный белок CID14ins или белок W155*, но причем мутантный аллель не является аллелем, кодирующим белок CID14ins с SEQ ID NO: 1. Таким образом, геном растения не содержит SEQ ID NO: 5 на хромосоме 8, которая представляет собой геномную последовательность, кодирующую белок CID14ins.

Аллели CID14, которые кодируют белки D14 с потерей функции, можно легко создать в условиях *de novo*. Например, путем случайного или целевого мутагенеза. В качестве двух специфических мутантных аллелей выступают мутанты W155* и Q255*, полученные в разделе Примеры. Однако любой другой мутантный аллель, наличие которого приводит к потере функции белка CID14, включен и может быть легко создан и протестирован его фенотип.

В другом аспекте мутантный аллель кодирует белок, в котором одна или несколько аминокислот вставлены, заменены или удалены, что приводит к снижению функции белка, но не к потере функции белка, в результате чего среднее количество вторичных ветвей больше, чем у растения, которое является гомозиготным по аллелю *CID14* дикого типа, но не настолько велико, как у растения, являющегося гомозиготным по мутантному аллелю CID14, кодирующему нефункциональный белок, такой как, например, белок CID14ins или белок W155*.

Растение арбуза в одном аспекте является гомозиготным по мутантному аллелю и производит увеличенное среднее количество вторичных ветвей (полное множественное ветвление или промежуточное множественное ветвление) по сравнению с растением, которое является гомозиготным по аллелю дикого типа. Также изобретение относится к семенам, из которых можно вырастить растение, имеющее повышенное среднее вторичное ветвление (полное множественное ветвление или промежуточное множественное ветвление).

Для исходного мутанта с множественным ветвлением (включающим дубликацию из 8 аминокислот, которая в настоящем документе называется белком CID 14ins) высокопроизводительный анализ генотипирования на основе ИДП-маркера (вставка/удаление) в мутантном аллеле, т.е. вставка 24 дополнительных нуклеотидов в мутантный/модифицированный аллель и «делеция» (отсутствие) этих 24 нуклеотидов в аллеле дикого типа была разработана для скрининга

геномной ДНК популяций растений, семян или частей растений на наличие INDEL. На Фигуре 4 показана геномная последовательность аллеля CID14 дикого типа (SEQ ID NO: 6; «Удаление 24 нуклеотидов») и мутантного/модифицированного аллеля (SEQ ID NO: 5, «Вставка 24 нуклеотидов»).

Две последовательности, содержащие ИДП, которые были использованы для создания двух прямых и одного обратного праймера для ПЦР, показаны в SEQ ID NO: 13 (последовательность «делеции», т.е. аллель дикого типа) и SEQ ID NO: 14 (последовательность «вставки», т.е. мутантный аллель). Это последовательности обратной цепи (-цепи) аллелей. Прямая цепь (плюс-цепь) показана в SEQ ID NO: 6 (геномная последовательность дикого типа) и SEQ ID NO: 5 (мутантная геномная последовательность со вставкой), а также на Фигуре 4.

Однако аналогичные анализы генотипирования могут быть разработаны (и включены в настоящий документ) для любого мутантного аллеля гена D14, например, любого мутанта, показанного в Таблице А или Таблице 2, или для других мутантных аллелей гена CID14.

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

- a) предоставление геномной ДНК одного или более растений арбуза или популяции растений, и
- b) проведение анализа генотипирования, который выявляет присутствие аллеля дикого типа SEQ ID NO: 6 (или его комплементарной цепи) и/или присутствие мутантного аллеля, причем мутантный аллель содержит один или несколько нуклеотидов, вставленных, удаленных, замененных или дублированных относительно SEQ ID NO: 6, и, при необходимости,
- c) выбор растения, семени, части растения, клетки или ткани, содержащей две копии аллеля дикого типа или одну копию аллеля дикого типа и одну копию мутантного аллеля, либо две копии мутантного аллеля.

На этапе b) мутация мутантного аллеля предпочтительно приводит к вставке, удалению или замене одной или более аминокислот по отношению к белку дикого типа.

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

- a) предоставление геномной ДНК одного или более растений арбуза или популяции растений (например, селекционной популяции, популяции F₂, популяции обратного скрещивания и т.д.), и
- b) проведение анализа генотипирования, который выявляет присутствие аллеля дикого типа, кодирующей белок SEQ ID NO: 2, и/или наличие мутантного аллеля, причем мутантный аллель содержит одну или более аминокислот, вставленных, удаленных, замененных или дублированных относительно SEQ ID NO: 2, и, при необходимости,
- c) выбор растения, семени, части растения, клетки или ткани, содержащей две копии аллеля дикого типа или одну копию аллеля дикого типа и одну копию мутантного аллеля, либо две копии мутантного аллеля.

Этап a) может включать выделение геномной ДНК из растения, семян, части растения, клетки или ткани для анализа при проведении анализа генотипирования. Часто можно использовать методы сырой экстракции ДНК, известные в данной области.

Этап b) предпочтительно включает анализ биаллельного генотипирования, в котором используются аллель-специфичные праймеры и/или аллель-специфичные зонды.

Растения с этапа a) могут быть мутагенизированы с использованием, например, химических или радиационных мутагенов или методов редактирования генов. Таким образом, перед этапом a) может проводиться этап обработки растений, семян или частей растения мутагенным агентом или индукции целевых мутаций в аллеле *CID14*.

Можно использовать различные анализы генотипирования, если они позволяют обнаружить ИДП и ОНП и позволяют различать аллель дикого типа SEQ ID NO: 6, присутствующий в геномной ДНК (в локусе *CID14* на хромосоме 8),

или мутантный аллель CID14, присутствующий в геномной ДНК. Анализы генотипирования обычно основаны на аллель-специфичных праймерах, используемых в ПЦР или реакциях термоциклирования (полимеразная цепная реакция) для амплификации аллеля дикого типа либо мутантного аллеля с обнаружением продукта амплификации, либо на аллель-специфичных олигонуклеотидных зондах, которые гибридизируются с аллелем дикого типа либо с аллелем с мутантным аллелем, либо и с тем и с другим. Например, при генотипировании с помощью зондов VHQplus используются два аллель-специфичных зонда и два праймера, которые фланкируют область полиморфизма, при этом во время термоциклирования полимеразы наталкивается на связанные с ДНК аллель-специфичные зонды и высвобождает флуоресцентный сигнал. Дискриминация аллелей включает конкурентное связывание двух аллель-специфичных зондов VHQPlus (см. также biosearchtech.com).

Примерами генотипирования являются анализ аллель-специфической ПЦР (компания LGC, см. www.LGCgenomics.com, а также www.biosearchtech.com/products/pcr-kits-and-reagents/genotyping-assays/kasp-genotyping-chemistry), основанный на конкурентной аллель-специфической ПЦР и флуоресцентном обнаружении по конечной точке, анализ TaqMan (Applied Biosystems), который также основан на ПЦР, анализы HRM (анализ кривых плавления с высоким разрешением), в которых аллель-специфические зонды обнаруживаются с помощью ПЦР в реальном времени, или анализ rhAmp, основанный на ПЦР, зависимой от РНК-азы и H₂, генотипирование VHQplus, генотипирование CoПраймер VHQplex и многие другие.

Анализ аллель-специфической ПЦР также описан в работах He C, Holme J, Anthony J. «Генотипирование ОНП: анализ аллель-специфической ПЦР. *Methods Mol Biol.* 2014; 1145:75-86» и EP1726664B1 или US7615620 B2, которые включены в настоящий документ в отсылочном порядке. В анализе генотипирования по аллель-специфической ПЦР используется уникальная форма конкурентной аллель-специфической ПЦР в сочетании с новой гомогенной системой передачи сигналов на основе флуоресценции для идентификации и измерения генетических изменений, происходящих на уровне нуклеотидов, с целью обнаружения однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) или вставок и делеций (ИДП). Технология KASP (использование аллель-специфической ПЦР) подходит для

применения на различных платформах оборудования и обеспечивает гибкость в отношении количества ОНП и анализируемых образцов. Химический состав аллель-специфической ПЦР одинаково хорошо работает в 96-, 384- и 1536-луночных микротитровальных планшетах и на протяжении многих лет используется в больших и малых лабораториях пользователями, работающими в области генетики человека, животных и растений.

Генотипирование TaqMan также описаны в работах Woodward J. «Биаллельное генотипирование с использованием анализа TaqMan®». *Methods Mol Biol.* 2014; 1145:67-74, US5210015 и US5487972, включенные в настоящий документ посредством отсылки. С применением технологии TaqMan(®) аллель-специфичные зонды используются для быстрого и надежного генотипирования известных полиморфных сайтов. Анализы TaqMan дают надежные результаты при генотипировании нескольких видов вариантов, включая однонуклеотидные полиморфизмы, инсерции/делеции и варианты присутствия/отсутствия. Для проверки одного биаллельного полиморфизма используются два зонда TaqMan, помеченные разными флуорофорами, которые устроены таким образом, что они гибридизируются с разными аллелями во время амплификации окружающей целевой области на основе ПЦР. Во время фазы удлинения праймера ПЦР 5'-3' экзонуклеазная активность Taq-полимеразы расщепляет и высвобождает флуорофоры из связанных зондов. В конце ПЦР измеряется интенсивность излучения каждого флуорофора и может быть произведено определение аллеля в запрашиваемом сайте.

Поэтому можно использовать различные анализы генотипирования, которые позволяют дифференцировать наличие аллеля дикого типа гена *CID14*, кодирующего белок SEQ ID NO: 2, или мутантного аллеля гена *CID14*. Могут быть обнаружены различные мутантные аллели гена *CID14*. Таким образом, не только мутантный аллель, кодирующий белок SEQ ID NO: 1 (содержащий 8 дополнительных аминокислот вследствие дубликации 24 нуклеотидов), но и анализ может быть разработан для обнаружения любого другого мутантного аллеля гена *CID14*, такого как любой мутантный аллель, например, как описано в Таблице А или Таблице 2 или в других разделах.

Как уже упоминалось, предпочтительно используется анализ биаллельного генотипирования, например, анализ аллель-специфической ПЦР, анализ TaqMan,

анализ BnQplus, генотипирование PACE (см. idtdna.com/pages/products/qpcr-and-pcr/genotyping/temp-snp-genotyping-assays) или любой другой анализ биаллельного генотипирования.

В одном аспекте анализ генотипирования на этапе b) вышеуказанных методов представляет собой анализ аллель-специфической ПЦР. Таким образом, на этапе b) выполняется конкурентная ПЦР с использованием двух прямых праймеров и одного общего обратного праймера. Два прямых праймера содержат, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов, комплементарных SEQ ID NO: 6 (или ее комплементарной цепи). Кроме того, два прямых праймера содержат 1, 2, 3 или более нуклеотидов (предпочтительно на 3'-конце праймеров), которые обеспечивают специфичность по отношению к ОНП или ИДП, что отличает последовательность дикого типа от мутантной последовательности аллеля. Таким образом, два прямых праймера имеют разную специфичность связывания (или предпочтение) по отношению к аллелю дикого типа или к мутантному аллелю. Например, Fam-праймер содержит 17 нуклеотидов последовательности дикого типа и 1 нуклеотид, специфичный для аллеля вставки, а VIC-праймер из раздела Примеров содержит 18 нуклеотидов аллеля дикого типа и 1 нуклеотид, специфичный для «делеционного» аллеля. Можно легко разработать анализ аллель-специфической ПЦР для дифференциации аллеля дикого типа SEQ ID NO: 6 и любого мутантного аллеля гена *CID14*, который отличается от аллеля дикого типа тем, что один или несколько нуклеотидов вставляются, удаляются или заменяются, например, анализ может быть разработан для любого ОНП или ИДП, который дифференцирует два аллеля.

Следует отметить, что анализы генотипирования, такие как аллель-специфической ПЦР, описанный, например, в разделе Примеров, также могут проводиться для обнаружения мутантного аллеля и/или аллеля *CID14* дикого типа в триплоидных или тетраплоидных растениях арбуза и частях растений таким же способом, как описано для диплоидных растений и частей растений арбуза.

В одном аспекте мутантный аллель гена *CID14* кодирует белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, замененных или удаленных относительно белка дикого типа SEQ ID NO: 2.

В одном аспекте мутантный аллель гена *CID14* кодирует белок, который укорочен по сравнению с белком SEQ ID NO: 2, например, по меньшей мере, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более аминокислот отсутствуют на С-конце или, при необходимости, на N-конце.

В одном аспекте мутантный аллель гена *CID14* кодирует белок, который содержит одну или более аминокислот, удаленных или замененных по сравнению с белком SEQ ID NO: 2, например, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот удалены или заменены одной или несколькими различными аминокислотами.

В другом аспекте мутантный аллель гена *CID14* кодирует белок, который содержит одну или более аминокислот, вставленных или дублированных по сравнению с белком SEQ ID NO: 2, например, вставлены или дублированы, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более аминокислот. В одном аспекте дублируются, по меньшей мере, одна или несколько аминокислот от аминокислоты 94 до аминокислоты 101 SEQ ID NO: 2, предпочтительно дублируется, по меньшей мере, S97. В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который включает дубликацию, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 последовательных аминокислот из аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2 дублируются, при этом предпочтительно, чтобы последовательные аминокислоты включали S97.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления предложен способ обнаружения и, при необходимости, селекции растения, семени или части растения арбуза, содержащего, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена под названием *CID14* (*Citrullus lanatus Dwarf14*), включающий следующее:

- a) предоставление геномной ДНК растения или множества растений арбуза (например, селекционной популяции, F2, обратного скрещивания и т.д.),
- b) проведение анализа (например, анализа биаллельного генотипирования), который различает или может различать наличие аллелей в геномной ДНК из пункта а), на основе амплификации нуклеиновой кислоты (например, включающей использование аллель-специфичных

олигонуклеотидных праймеров), и/или гибридизации нуклеиновой кислоты (например, включающей использование аллель-специфичных олигонуклеотидных зондов) для обнаружения присутствия аллеля гена дикого типа и/или мутантного аллеля гена, причем аллель дикого типа содержит последовательность SEQ ID NO: 6 (или причем аллель дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 2), а мутантный аллель содержит один или несколько нуклеотидов, вставленных, дублированных, удаленных или замененных относительно последовательности SEQ ID NO: 6 (или мутантный аллель кодирует белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, удаленных или замененных относительно белка дикого типа SEQ ID NO: 2), и, при необходимости,

- c) селекцию растения, семени или части растения, содержащего одну или две копии мутантного аллеля.

На этапе b) анализ генотипирования различает аллели дикого типа и мутантные аллели на основе реакций амплификации нуклеиновых кислот (особенно ДНК) с использованием, например, олигонуклеотидных праймеров, таких как ПЦР (полимеразная цепная реакция) и праймеров ПЦР, предпочтительно аллель-специфичных праймеров, и/или гибридизации нуклеиновых кислот с предпочтительным использованием аллель-специфичных зондов в качестве олигонуклеотидных зондов.

Праймеры или зонды предпочтительно модифицируются так, чтобы они содержали метку, например флуоресцентную, или хвостовую последовательность или другую модификацию.

В одном аспекте в любом из вышеперечисленных методов в рамках анализа используется один или несколько аллель-специфичных праймеров *CID14* или один или несколько аллель-специфичных зондов *CID14*. Как упоминалось ранее, на основе геномной последовательности SEQ ID NO: 6 или других (например, вырожденных) геномных последовательностей, которые кодируют белок SEQ ID NO: 2, или геномной последовательности мутантного аллеля, который кодирует, например, белок, содержащий одну или более вставленных аминокислот, дублированных, удаленных или замененных по сравнению с SEQ ID NO: 2, с использованием известных способов или программ программного обеспечения для

дизайна олигонуклеотидов могут создаваться ПЦР-праймеры и зонды нуклеиновых кислот. Праймеры и зонды могут, например, иметь длину, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более нуклеотидов (оснований) и ренатурировать (или гибридизироваться) с матричной последовательностью ДНК, т.е. они предпочтительно имеют, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с целевой последовательностью. Специфичность праймера или зонда по аллелю дикого типа или мутантному аллелю обусловлена тем, что, по меньшей мере, 1, 2, 3 или более нуклеотида праймера или зонда специфичны для любого аллеля. Таким образом, праймеры или зонды конструируются с учетом полиморфизма (например, ОНП или ИДП) между двумя аллелями целевого гена, в результате чего они различают их. В одном аспекте анализ представляет собой анализ биаллельного генотипирования, выбранный, например, из анализа аллель-специфической ПЦР, анализа TaqMan, анализа зонда VNQplus или любого другого анализа биаллельного генотипирования.

В одном аспекте мутантный аллель содержит, по меньшей мере, один кодон, вставленный или дублированный в кодирующей области аллеля, или, по меньшей мере, один кодон, замененный на другой кодон (например, посредством замены одного нуклеотида), или, по меньшей мере, один кодон, удаленный или замененный на стоп-кодон.

В любом из вышеперечисленных способов в одном аспекте мутантный аллель включает последовательность SEQ ID NO: 5, т.е. включает вставку/дубликацию 24 нуклеотидов, приводящую к дубликации 8 аминокислот в белке. Таким образом, в одном аспекте способы можно использовать для различения растений, семян или частей растений, содержащих две копии белка, кодирующего аллель CID14 дикого типа, с SEQ ID NO: 2, две копии белка, кодирующего мутантный аллель CID14, с SEQ ID NO: 1, или одну копию каждого аллеля (гетерозиготную). При необходимости, растения, части растений или семена, содержащие любой из этих генотипов, могут быть выбраны, например, для дальнейшей селекции или для использования в производстве арбузов.

При использовании любого из вышеперечисленных способов в другом аспекте мутантный аллель кодирует мутантный белок, описанный в настоящем документе, например, в Таблице А или Таблице 2. Таким образом, в одном аспекте

способы можно использовать для различения растений, семян или частей растений, содержащих две копии белка, кодирующего аллель CID14 дикого типа, с SEQ ID NO: 2, две копии мутантного аллеля CID14, кодирующего мутантный белок, описанный в настоящем документе, например, в таблице А или таблице 2, или одну копию каждого аллеля (гетерозиготную). При необходимости, растения, части растений или семена, содержащие любой из этих генотипов, могут быть выбраны, например, для дальнейшей селекции или для использования в производстве арбузов.

Таким образом, в одном аспекте в любом из вышеперечисленных методов мутантный аллель кодирует белок с потерей функции или белок с пониженной функцией согласно представленному описанию.

Хотя в вышеуказанных методах можно использовать любой анализ генотипирования ДНК, будь то на основе ПЦР (с использованием праймеров ПЦР) и/или на основе гибридизации (с использованием зондов), в одном аспекте анализ аллель-специфической ПЦР используется для различения аллеля дикого типа и мутантного аллеля. Анализ можно использовать с высокой производительностью, например, в 96-луночных планшетах или в планшетах с более значительным количеством лунок (например, в 384-луночных планшетах).

В зависимости от ОНП или ИДП между аллелем *CID14* дикого типа и мутантным аллелем *CID14* для использования в анализах могут разрабатываться различные аллель-специфичные праймеры и зонды.

В одном аспекте в анализе аллель-специфической ПЦР используются два прямых праймера (один для аллеля дикого типа и один для мутантного аллеля) и один общий обратный праймер (как для аллеля дикого типа, так и для мутантного аллеля). В одном аспекте два прямых праймера и обратный праймер содержат, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 6 или комплементарной последовательности с SEQ ID NO: 6. Прямые праймеры дополнительно содержат, по меньшей мере, 1, 2 или 3 нуклеотида (предпочтительно на 3'-конце праймера), которые придают специфичность (или отдают предпочтение) амплификации аллеля дикого типа или амплификации мутантного аллеля. Все прямые праймеры образуют пару праймеров с общим обратным праймером для амплификации последовательности ДНК целевого

аллеля между парой праймеров во время термоциклирования. Используются стандартные компоненты для термоциклирования и стандартные компоненты для анализов аллель-специфической ПЦР.

В одном аспекте анализ аллель-специфической ПЦР различает ИДП, обнаруженный в аллеле *CID14*, т.е. анализ аллель-специфической ПЦР может различать между наличием в геномной ДНК SEQ ID NO: 6 в гомозиготной форме (*CID14* дикого типа, аллель с нормальным ветвлением), наличием SEQ ID NO: 5 в гомозиготной форме (аллель *CID14* со вставкой, аллель с множественным ветвлением) и наличие одновременно SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 5 в геноме арбуза. Для достижения дискриминации аллелей в рамках анализа можно разработать различные прямые и обратные праймеры.

В одном аспекте прямые праймеры содержат последовательность SEQ ID NO: 10 и/или SEQ ID NO: 11 или комплементарную последовательность любой из них. В одном аспекте общий праймер, при необходимости, содержит последовательность SEQ ID NO: 12 или ее комплементарную последовательность.

В одном аспекте праймеры содержат одну или более из SEQ ID NO: 10 (прямой праймер), SEQ ID NO: 11 (прямой праймер) и SEQ ID NO: 12 (общий праймер), или последовательность содержащую, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, SQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, или последовательность, комплементарную любой из этих последовательностей.

В еще одном варианте осуществления предусмотрен способ получения продукта гибридизации или продукта амплификации аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена *CID14* (*Citrullus lanatus Dwarf14*), включающий:

- a) предоставление геномной ДНК растения или множества растений арбуза (например, селекционной популяции, F2, обратного скрещивания и т.д.),
- b) проведение анализа (например, анализа биаллельного генотипирования), который различает или может различать наличие аллелей в геномной ДНК из пункта а), при этом анализ на выходе выдает продукт амплификации нуклеиновой кислоты (например, посредством использования аллель-специфичных олигонуклеотидных праймеров)

для получения продукта) и/или же этот анализ на выходе выдает продукт гибридизации нуклеиновой кислоты (например, посредством использования аллель-специфичных олигонуклеотидных зондов для получения продукта гибридизации), при этом продукт амплификации или продукт гибридизации указывает на присутствие аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена в ДНК, причем аллель дикого типа содержит последовательность SEQ ID NO: 6 (или причем аллель дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 2), а мутантный аллель содержит один или несколько нуклеотидов, вставленных, дублированных, удаленных или замененных относительно последовательности SEQ ID NO: 6 (или мутантный аллель кодирует белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, удаленных или замененных относительно белка дикого типа SEQ ID NO: 2), и, при необходимости,

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

Также предусмотрен способ амплификации всего или части мутантного аллеля и/или аллеля *CID14* дикого типа образца геномной ДНК, полученного из растения, части растения или семени арбуза, включающий приведение геномной ДНК в контакт с парой праймеров, которая амплифицирует весь или часть мутантного аллеля *CID14* или аллеля *CID14* дикого типа в образце и обнаружение продукта амплификации.

Также предусмотрен способ гибридизации зонда до мутантного аллеля и/или аллеля *CID14* дикого типа образца геномной ДНК, полученного из растения, части растения или семени арбуза, включающий приведение геномной ДНК в контакт с олигонуклеотидным зондом, который гибридизируется до мутантного аллеля *CID14* или аллеля *CID14* дикого типа в образце и обнаружение продукта гибридизации.

Все варианты осуществления, описанные выше и в других разделах по тексту настоящего документа, также применимы и к этим вариантам осуществления. Таким образом, продукт амплификации может представлять собой продукт ПЦР-амплификации, например, продукт конкурентной ПЦР-амплификации, полученный, например, с помощью анализа аллель-специфической

ПЦР или другого анализа, для обнаружения мутантного аллеля и/или аллеля дикого типа в образце ДНК. Таким образом, продукт гибридизации может представлять собой продукт гибридизации олигонуклеотидного зонда, который гибридизируется с нуклеиновой кислотой в образце ДНК для обнаружения в образце ДНК мутантного аллеля и/или аллеля дикого типа. Пары праймеров или зонды предпочтительно являются аллель-специфичными, и таким образом продукты можно отличить по двум копиям аллеля дикого типа, двум копиям мутантного аллеля или одной копии каждого из них, которые присутствуют в геномной ДНК растения, части растения или семени арбуза.

Праймеры или зонды предпочтительно модифицированы, например, помечены хвостовой последовательностью или флуоресцентной меткой или модифицированы иным образом относительно последовательности дикого типа, которую они амплифицируют или гибридизируют.

Поскольку описанные способы требуют обнаружения мутантного аллеля и/или аллеля дикого типа в геномной ДНК растения, части растения или семени, то геномная ДНК должна быть доступна для обнаружения, например, она может быть извлечена из растительных клеток с использованием методов экстракции ДНК или, по меньшей мере, элюирована из поврежденных клеток в раствор (например, буферный раствор).

Поскольку в настоящем документе представлены гены-ортологи других тыквенных, вышеуказанные способы также можно применять к другим генам и аллелям D14 у других видов, особенно у огурца и дыни.

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

- a) предоставление геномной ДНК одного или более растений арбуза, огурца или дыни или популяции растений (например, селекционной популяции, F₂, обратного скрещивания и т.д.), и
- b) проведение анализа генотипирования, который способен обнаружить или обнаруживает присутствие аллеля дикого типа с SEQ ID NO: 6 или, по меньшей мере, 95% идентичности с ней (ген арбуза) или SEQ ID NO: 15, или содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней

(ген огурца) или SEQ ID NO: 16 или содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней (ген дыни), и/или наличие мутантного аллеля, причем мутантный аллель содержит один или несколько нуклеотидов, вставленных, удаленных, замененных или дублированных в отношении SEQ ID NO: 6 (или в отношении последовательности дикого типа, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней), SEQ ID NO: 15 (или в отношении последовательности дикого типа, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней) или SEQ ID NO: 16 (или в отношении последовательности дикого типа, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней), и, при необходимости,

- c) выбор растения, семени, части растения, клетки или ткани, содержащей две копии аллеля дикого типа или одну копию аллеля дикого типа и одну копию мутантного аллеля, либо две копии мутантного аллеля.

В одном аспекте представлен анализ генотипирования растений, частей растений, клеток или тканей арбуза, дыни или огурца, включающий следующие этапы:

- a) предоставление геномной ДНК одного или более растений арбуза, огурца или дыни или популяции растений (например, селекционной популяции, F2, обратного скрещивания и т.д.), и
- b) выполнение анализа генотипирования, который способен обнаружить (или обнаруживает) присутствие белка, кодирующего аллель дикого типа, с SEQ ID NO: 2, или белка, последовательность которого, по меньшей мере, на 95% идентична ей (белок арбуза CID14 дикого типа) или SEQ ID NO: 8 или белка, последовательность которого, по меньшей мере, 95% идентична ей (белок огурца CID14 дикого типа) или SEQ ID NO: 9, или белка, последовательность которого, по меньшей мере, 95% идентична ей (белок дыни CID14 дикого типа), и/или наличие мутантного аллеля, причем мутантный аллель содержит одну или более аминокислот, вставленных, удаленных, замененных или дублированных в отношении SEQ ID NO: 2 (или в отношении последовательности дикого типа, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней), или SEQ ID NO: 8 (или в отношении

последовательности дикого типа, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней) или SEQ ID NO: 9 (или в отношении последовательности дикого типа, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней), и, при необходимости,

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

Таким образом, предложен способ обнаружения и, при необходимости, селекции растения, семени или части растения арбуза, огурца или дыни, содержащего, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена под названием *CID14* (*Citrullus lanatus* Dwarf14), *CsD14* (*Cucumis sativus* Dwarf14) или *CmD14* (*Cucumis melo* Dwarf14) включающий следующее:

- а) выполнение анализа образца геномной ДНК, полученного, по меньшей мере, из одного растения, который обнаруживает или различает аллели D14 на основе амплификации и/или гибридизации нуклеиновой кислоты, с целью выявить присутствие аллеля дикого типа гена и/или мутантного аллеля гена, причем аллель дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 2, или белок, последовательность которого, по меньшей мере, на 95% идентична ей (в арбузе), SEQ ID NO: 8, или белок, последовательность которого, по меньшей мере, на 95% идентична ей (в огурце), и SEQ ID NO: 9, или белок, содержащий, по меньшей мере, 95 % идентичности последовательности (в дыне) и мутантный аллель содержит одну или более аминокислот, вставленных, удаленных или замененных по отношению к SEQ ID NO: 2 (или по отношению к последовательности дикого типа, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней), SEQ ID NO: 8 (или в отношении последовательности дикого типа, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней) или SEQ ID NO: 9 (или в отношении последовательности дикого типа, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней), и, при необходимости,
- б) селекцию растения, семени или части растения, содержащего одну или две копии мутантного аллеля.

Кроме того, предусмотрен способ определения генотипа гена D14 и, при необходимости, селекции растения, семени или части растения арбуза, огурца или дыни, содержащего определенный генотип, например, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена с названием *CID14* (*Citrullus lanatus Dwarf14*), *CsD14* (*Cucumis sativus Dwarf14*) или *CmD14* (*Cucumis melo Dwarf14*), включающий следующее:

- а) выполнение анализа биаллельного генотипирования на одном или нескольких образцах геномной ДНК, полученных из одного или более растений, причем указанный анализ генотипирования обнаруживает или различает аллели D14 на основе аллель-специфичных праймеров D14 и/или аллель-специфичных зондов D14, при этом данные аллель-специфичные праймеры или аллель-специфические зонды обнаруживают наличие аллеля гена дикого типа или мутантного аллеля гена, а аллель дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 2, или белок, последовательность которого, по меньшей мере, на 95% идентична ей (в арбузе), SEQ ID NO: 8, или белок, последовательность которого, по меньшей мере, 95% идентична ей (в огурце), и SEQ ID NO: 9, или белок, содержащий, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности (в дыне) и мутантный аллель содержит одну или более аминокислот, вставленных, удаленных или замененных по отношению к SEQ ID NO: 2 (или по отношению к последовательности дикого типа, которая, по меньшей мере, на 95% идентична ней), SEQ ID NO: 8 (или в отношении последовательности дикого типа, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней) или SEQ ID NO: 9 (или в отношении последовательности дикого типа, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности с ней), и, при необходимости,
- б) селекцию одного или более растений, семян или частей растения, содержащих одну или две копии мутантного аллеля.

Такой анализ можно использовать для маркерной селекции (MAS) растений, например, в программе селекции для отбора растений, содержащих определенный генотип, например, гомозиготных по аллелю дикого типа гена D14 (имеющих нормальное вторичное ветвление), гомозиготных или гетерозиготных по мутантному аллелю D14.

Таким образом, в настоящем документе также предложен способ селекции растений арбуза, огурца или дыни, причем указанный способ включает генотипирование одного или более растений по составу аллелей в локусе D14 в геноме и, при необходимости, селекцию одного или более растений, имеющих специфический генотип в локусе D14. В одном аспекте для гена D14 также может выполняться генотипирование путем секвенирования.

Как уже упоминалось ранее, при необходимости, растения или семена, которые содержат две копии мутантного аллеля D14, можно выращивать и фенотипировать по фенотипу вторичного ветвления. Мутантный аллель в одном аспекте представляет собой мутантный аллель, который в гомозиготной форме обеспечивает множественное ветвление /повышенное вторичное ветвление. В одном аспекте мутантный аллель обеспечивает «полное множественное ветвление» в гомозиготной форме. В другом аспекте мутантный аллель обеспечивает «промежуточное множественное ветвление» в гомозиготной форме. Таким образом, мутантный аллель может содержать один или несколько замененных, вставленных или удаленных нуклеотидов, в результате чего кодируемый белок теряет функцию или в результате аллель не экспрессируется в растении, что приводит к «полному множественному ветвлению», когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, или же мутантный аллель может содержать один или несколько замененных, вставленных или удаленных нуклеотидов, в результате чего кодируемый белок имеет пониженную функцию или аллель имеет пониженную экспрессию в растении, что приводит к «промежуточному множественному ветвлению», когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, который имеет пониженную функцию или утратил функцию в условиях *in vivo* благодаря тому, что белок содержит, по меньшей мере, одну аминокислоту домена IPR000073 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 (или эквивалентные аминокислоты в белке, имеющие, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из них), которая удаляется или замещается другой аминокислотой или стоп-кодоном. В другом аспекте мутантный аллель кодирует белок, который имеет пониженную функцию или утратил функцию в условиях *in vivo* благодаря тому, что белок, содержащий, по меньшей мере, одну аминокислоту, которая вставляется или дублируется в домене

IPR000073 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 (или эквивалентные аминокислоты в белке, которые, по меньшей мере, на 95% идентичны любой из них).

В другом аспекте мутантный аллель кодирует белок, который имеет пониженную функцию или утратил функции в условиях *in vivo* благодаря тому, что белок содержит, по меньшей мере, одну аминокислоту домена спиральной крышки SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 (или эквивалентные аминокислоты в белке, имеющие, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из них), которая удаляется или замещается другой аминокислотой или стоп-кодоном. В другом аспекте мутантный аллель кодирует белок, который имеет пониженную функцию или утратил функцию в условиях *in vivo* благодаря тому, что белок содержит, по меньшей мере, одну аминокислоту, которая вставляется или дублируется в домене спиральной крышки домена SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 (или эквивалентные аминокислоты в белке, которые, по меньшей мере, на 95% идентичны любой из них).

В другом аспекте мутантный аллель кодирует белок, который имеет пониженную функцию или утратил функцию в условиях *in vivo* благодаря тому, что белок содержит, по меньшей мере, одну аминокислоту домена каталитической триады SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 (или эквивалентную аминокислоту в белке, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности любой из них), или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислоты, предшествующие или следующие за аминокислотой каталитической триады, которые удаляются или замещаются другой аминокислотой или стоп-кодоном. В другом аспекте мутантный аллель кодирует белок, который имеет пониженную функцию или утратил функцию в условиях *in vivo* благодаря тому, что белок содержит, по меньшей мере, одну аминокислоту домена каталитической триады SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 (или эквивалентные аминокислоты в белке, имеющие, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из них), которые дублируются, или же, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислоты, предшествующие или следующие за аминокислотой каталитической триады, которые дублируются, или, по меньшей мере, одна аминокислота вставляется в участок из 8 аминокислот, предшествующих или следующих за аминокислотой каталитической триадой.

В еще одном аспекте мутантный аллель кодирует белок из Таблицы А или Таблицы 2.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, содержащий дубликацию, по меньшей мере, одной аминокислоты, выбранной из аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 (или эквивалентные аминокислоты в белке, имеющие, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из них).

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, содержащий дубликацию, по меньшей мере, серина 97 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 (или эквивалентную аминокислоту в белке, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из них).

В еще одном дополнительном аспекте мутантный аллель кодирует белок, содержащий дубликацию аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 (или эквивалентные аминокислоты в белке, имеющие, по меньшей мере, 95% идентичности с любой из них).

Аспекты, описанные дополнительно выше для анализов с целью обнаружения аллелей дикого типа и/или мутантных аллелей CID14 арбуза, также применимы и к анализам для обнаружения аллелей дикого типа и/или мутантных аллелей CsD14 огурца или аллелей дикого типа и/или мутантных аллелей CmD14 дыни.

В другом аспекте предусмотрено растение, семя или часть растения арбуза, огурца или дыни, содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена под названием CID14 в арбузе, *CsD14* в огурце и *CmD14* в дыне, причем указанный мутантный аллель

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

причем указанный мутантный аллель a) или b) обеспечивает развитие увеличенного среднего количества вторичных ветвей, когда мутантный аллель

находится в гомозиготной форме (по сравнению с растением, содержащим аллель дикого типа в гомозиготной форме), и при этом аллель CID14 арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 2 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, причем аллель CsD14 огурца дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 8 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, причем аллель CmD14 дыни дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 9 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9.

Функциональный белок D14 арбуза дикого типа предусмотрен в SEQ ID NO: 2, огурца – в SEQ ID NO: 8, и дыни – в SEQ ID NO: 9. Тем не менее, в арбузах, огурцах и дынях могут присутствовать некоторые вариации аминокислотной последовательности, а функциональные белки D14 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: 2, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9, представленных в настоящем документе, или причем белок содержит, по меньшей мере, 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 белками SEQ ID NO: 2, 8 или 9 (при попарном выравнивании, например, с использованием Emboss-Needle). Такие функциональные варианты белка D14 SEQ ID NO: 2, 8 или 9 могут существовать в других линиях или разновидностях. Таким образом, эти аллели могут различаться по последовательности, при этом фенотип растения аналогичен фенотипу дикого типа. Такие функциональные варианты аллелей (аллельные варианты) могут быть обнаружены, например, путем секвенирования гена D14 многих различных линий или сортов арбуза, огурца или дыни, которые имеют нормальную схему вторичного ветвления.

Поэтому в одном аспекте функциональные варианты белков SEQ ID NO: 2, 8 или 9 представляют собой белки, которые, 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% идентичны последовательности белка SEQ ID NO: 2, 8 или 9, при парном выравнивании (например, с использованием Needle с параметрами по умолчанию).

В одном аспекте предусмотрено растение, семя или часть растения арбуза, огурца или дыни, содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена D14, причем указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, удаленных или замененных в области белка, выбранного из следующего:

- a) область, начинающаяся с аминокислоты 94 и заканчивающаяся аминокислотой 101 SEQ ID NO: 2, 8, 9 или эквивалентные аминокислоты в варианте белка D14, имеющие, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 8 или 9.
- b) область домена IPR000073, начинающаяся с аминокислоты 22 и заканчивающаяся аминокислотой 259 SEQ ID NO: 2, 8, 9, или эквивалентные аминокислоты в варианте белка D14, имеющие, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 8 или 9.
- c) область домена спиральной крышки, начинающаяся с аминокислоты 136 и заканчивающаяся аминокислотой 193 SEQ ID NO: 2, 8, 9 или эквивалентные аминокислоты в варианте белка D14, имеющие, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 8 или 9.
- d) аминокислоты каталитической триады или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот, предшествующих или следующих за аминокислотами каталитической триады S97, D218 и H247 SEQ ID NO: 2, 8 или 9 или эквивалентные аминокислоты в варианте белка D14, имеющие, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 8 или 9.

и причем указанный мутантный аллель обеспечивает (в значительной степени) увеличенное среднее количество вторичных ветвей, развивающихся, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, предпочтительно фенотип с промежуточным множественным ветвлением или полным множественным ветвлением, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме.

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

По пункту а) может осуществляться вставка, дублирование, удаление и/или замена одной или более аминокислот в области белка, начиная с аминокислоты 94 и заканчивая аминокислотой 101 SEQ ID NO: 2, 8 или 9, вставку, дублированную, удаление/или замену, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот, предпочтительно, по меньшей мере, S97.

В одном аспекте, по тонкий мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 последовательных аминокислот из числа аминокислот с 94 по 101 дублируются, удаляются или заменяются, предпочтительно включая, по меньшей мере, дублирование, удаление или замену S97. В одном аспекте мутантный аллель включает дубликацию или удаление или замену H96 (гистидин 96) и S97 (серин 97); или S97 (серин 97) и V98 (валин 98); или H96 (гистидин 96), S97 (серин 97) и V98 (валин 98); или G95 (глицин 95), H96 (гистидин 96), S97 (серин 97), V98 (валин 98) и S99 (серин 99); или V94 (валин 94), G95 (глицин 95), H96 (гистидин 96), S97 (серин 97), V98 (валин 98), S99 (серин 99) и A100 (аланин 100); или V94 (валин 94), G95 (глицин 95), H96 (гистидин 96), S97 (серин 97), V98 (валин 98), S99 (серин 99), A100 (аланин 100) и M101 (метионин 101).

В другом аспекте предложено растение, семя или часть растения арбуза, огурца или дыни, содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена D14, причем указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, удаленных или замененных в области белка, начиная с аминокислоты 197 и заканчивая аминокислотой 249 SEQ ID NO: 2, 8 или 9 или эквивалентные аминокислоты в варианте белка D14, имеющие, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 8 или 9, а также причем указанный мутантный аллель обеспечивает увеличенное среднее количество вторичных ветвей, развивающихся, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме. Таким образом одним из аспектов является вставка, дублирование, удаление и/или замена одной или более аминокислот в области белка, начиная с аминокислоты 197 и заканчивая аминокислотой 249 SEQ ID NO: 2, 8 или 9, вставку, дублированную, удаление/или замену, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот, предпочтительно, по меньшей мере, D218 или H247.

В еще одном аспекте предусмотрено растение, семя или часть растения арбуза, огурца или дыни, содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного

аллеля гена D14, причем указанный мутантный аллель кодирует мутантный белок, содержащий, по меньшей мере, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 или более аминокислот, которые вставлены, дублированы, удалены и/или заменены в SEQ ID NO: 2, 8 или 9 или в варианте белка D14 или в белке, имеющем, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 8 или 9, и причем указанный мутантный аллель обеспечивает модифицированный фенотип, описанный, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме. Таким образом, мутантный белок D14 может быть, например, укорочен на N-конце или C-конце, при этом отсутствуют указанные, по меньшей мере, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 аминокислот на N-конце или C-конце или любые другие, по меньшей мере, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 аминокислот могут быть удалены, заменены, вставлены или дублированы по сравнению с функциональным белком D14 дикого типа. В одном аспекте, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот (предпочтительно последовательные аминокислоты) удаляются, дублируются или заменяются, при этом удаление, дубликация или замена включает аминокислоту каталитической триады, выбранную из S97, D218 и H247 SEQ ID NO: 2, 8 или 9 или эквивалентную аминокислоту в варианте последовательности любого из них.

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 или целевого мутагенеза, можно создать или реконструировать любую мутацию, например, мутанты, описанные в настоящем документе, можно легко создать в условиях *de novo*. Праймеры TILLING могут, например, разрабатываться для конкретных мутаций в аллеле, что позволяет идентифицировать их в условиях *de novo*, например, растения M2, содержащие мутанты, описанные в настоящем документе. Мутантный аллель, присутствующий в сорте Sidekick F1, также можно получить в условиях *de novo*. Для осуществления возможности раскрытия последовательности гена не требуется внесения семян. Аналогичным образом, направленное редактирование генов можно использовать для создания любой желаемой мутации в аллеле.

ТИЛЛИНГ описан, например, в работе McCallum, et al. (июнь 2000 г.) «Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics», *Plant Physiol.* 123 (2): 439–42

В одном аспекте мутантный аллель гена CID14 не представлен мутантным аллелем, который присутствует в сорте Sidekick F1, а другой мутантный аллель, например, один или несколько нуклеотидов могут быть разными, но, например, из-за вырожденности генетического кода кодируемый мутантный белок может оставаться тем же самым (т.е. белок с SEQ ID NO: 1), или одна или несколько аминокислот могут отличаться от SEQ ID NO: 1 (т.е. попарное выравнивание мутантных белков не дает 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1). Например, вместо дублирования 8 аминокислот могут дублироваться только 5, 6 или 7 аминокислот; или могут дублироваться 9, 10 или 11 аминокислот. В другом аспекте мутантный аллель гена CID14 идентичен мутантному аллелю, присутствующему в сорте Sidekick F1, но индуцируется *de novo* методами мутагенеза, такими как методы на основе CRISPR.

Любой мутантный аллель в гене CID14, CsD14 или CmD14, наличие которого приводит к появлению вставки, удаления и/или замены одной или более аминокислот функционального белка дикого типа, может привести к появлению мутантного белка с пониженной функцией или с отсутствием функции и, таким образом, может обеспечить ситуацию, при которой в фенотипе развивается значительно больше вторичных ветвей, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме. Растения и части растений, содержащие такие мутантные аллели, являются одним из вариантов осуществления настоящего изобретения.

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

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, содержащий дубликацию или вставку кодонов аминокислоты с номером S97, D218 или H247 SEQ ID NO: 2, 8 или 9, или эквивалентной аминокислоты в белке, содержащем, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 8 или 9.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, содержащий дублирование или вставку кодонов одной или более аминокислот с номерами от 94 до 101 SEQ ID NO: 2, 8 или 9, или эквивалентной аминокислоты в белке, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9.

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 белок, содержащий аминокислотную замену (замену) или делецию, или стоп-кодон аминокислоты с номером S97, D218 или H247 SEQ ID NO: 2, 8 или 9, или эквивалентной аминокислоты в белке, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9.

В одном аспекте мутантный аллель кодирует мутантный белок CID14, CsD14 или CmD14, который содержит усечения, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 113, 115, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 аминокислот С-концевой области белка SEQ ID NO: 2, 8 или 9 или С-концевой области белка, содержащего, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 8 или 9. В одном аспекте все аминокислоты, начиная с (и включая) аминокислоты 94, 95, 96 или 97, или начиная с (и включая) аминокислоты 218, или начиная с (и включая) аминокислоты 247 SEQ ID NO: 2, 8 или 9, или эквивалентной аминокислоты в белке, содержащем, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 8 или 9, удалены или заменены одной или несколькими различными аминокислотами.

Как уже упоминалось ранее, растение или часть растения арбуза, огурца или дыни может содержать мутантный аллель *D14*, причем мутантный аллель получается путем случайного или целевого мутагенеза, такого как методы, основанные на CRISPR. Случайный мутагенез может быть представлен, например,

химически индуцированным (например, обработка этилметансульфонатом) 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 *D14*, можно проверить и идентифицировать. Направленный мутагенез – это методы, при которых мутации специфически вводятся в целевой ген, такой как ген *D14*, с использованием, например, *Crispr-Cas9* или *Crispr-Cpf1* или другими известными способами.

В одном аспекте растение, содержащее мутантный аллель, не производится исключительно в результате по существу биологического процесса, а 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, огурца или дыни является диплоидным и содержит, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *D14* согласно описанию выше, т.е. растение является гетерозиготным. Поскольку фенотип проявляется только тогда, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, эти растения имеют нормальное вторичное ветвление. Самоопыление таких гетерозиготных растений приведет к образованию гомозиготного растения, содержащего две копии мутантного аллеля. В одном аспекте растение арбуза является диплоидным и содержит две копии мутантного аллеля *D14* 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 *D14*, предпочтительно являются культурными, а не дикими. Поэтому предпочтительно выращивать арбуз (*Citrullus lanatus*)? огурец или дыню. Растение может представлять собой инбредную линию, гибрид F1 или линию 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 *CID14*. 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 *CID14*. Следует отметить, что способы генотипирования или анализы, описанные в настоящем документе для диплоидных растений, семян и частей растений, в равной степени применимы к триплоидным или тетраплоидным растениям, семенам или тканям/частям растений. Можно отобрать триплоидные растения, семена или части, содержащие 1, 2 или 3 копии мутантного аллеля *CID14* или аллеля дикого типа, а также можно отобрать тетраплоидные растения, содержащие 1, 2, 3 или 4 копии мутантного аллеля *CID14* или аллеля дикого типа. Например, анализ аллель-специфической ПЦР можно использовать для анализа триплоидной и тетраплоидной геномной ДНК на предмет присутствия аллелей *CID14* и числа их копий.

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

Часть растения, содержащая, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *D14*, 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 *D14* в своем геноме.

В одном аспекте также предусмотрен способ получения диплоидных плодов арбуза с семенами, причем указанный способ включает выращивание диплоидного растения арбуза, содержащего одну или две копии мутантного аллеля *CID14*, позволяющего опылять цветки и, при необходимости, собирать диплоидные семена арбуза, которые развиваются в растении, при этом ткань плода также содержит одну или две копии мутантного аллеля *CID14*.

В одном аспекте также предусмотрен способ получения бессемянных плодов арбуза, причем указанный способ включает выращивание диплоидного растения арбуза, содержащего две копии мутантного аллеля *CID14*, вблизи

триплоидного растения арбуза, что позволяет опылять цветки триплоидного растения пыльцой диплоидного растения и, при необходимости, собирать бессемянные плоды, которые развиваются на триплоидном растении, и/или плоды с семенами, которые развиваются на диплоидном растении после самоопыления диплоидного растения.

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 рядов 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.

В одном аспекте мутантный аллель *CID14* может комбинироваться с другими генами, такими как Ts-ген (ген размера семени томата) на хромосоме 2 согласно описанию в WO2021/165091. При комбинировании описанных в настоящем документе мутантных аллелей *CID14* с делецией Ts-гена или мутантных аллелей, кодирующих, например, пониженную функцию или потерю функции Ts-белка, растения, имеющие фенотип «сильного множественного ветвления» или «промежуточного множественного ветвления» согласно описанию в настоящем документе могут давать плоды с мелкими семенами. Поскольку размер семян определяется локусами хромосомы 2 и хромосомы 6 (как описано в WO 2021/165091), плоды растений, описанных в настоящем документе, фактически могут иметь любой размер семян, от большого до среднего и очень маленького.

Тем не менее, описанные в настоящем документе аллели *CID14* также могут комбинироваться с генами, обуславливающими партенокарпию или стеноспермокарпию, так что бессемянные плоды можно получить на растениях, имеющих фенотип «сильного множественного ветвления» или «промежуточного множественного ветвления» согласно описанию в настоящем документе. См. WO2022/096451, WO2022/078792, WO2019238832, WO2018060444 или

WO2017202715. Все эти документы включены в настоящий документ посредством отсылки.

Также предусмотрен способ скрининга растений, частей растений или их ДНК на наличие мутантного аллеля гена под названием CID14, CsD14 или CmD14, или для селекции растения или части растения, содержащего мутантный аллель гена под названием CID14, CsD14 или CmD14, или для получения растения или части растения, содержащего мутантный аллель гена под названием CID14, CsD14 или CmD14, причем 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, дублированных и/или делетированных по сравнению с белком дикого типа,

причем аллель арбуза дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 2 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, причем аллель огурца дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 8 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, причем аллель дыни дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 9 или белок, имеющий, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9.

Как уже упоминалось ранее, описанные в настоящем документе способы предпочтительно относятся к описанным в нем мутантным аллелям, которые при нахождении в гомозиготной форме обеспечивают появление фенотипов «полного множественного ветвления» или «промежуточного множественного ветвления» растения.

Способ скрининга растений, частей растений или их ДНК включает предоставление геномной ДНК или информации о последовательности геномной ДНК, определение последовательности гена D14 в геномной ДНК и сравнение последовательности гена с последовательностью гена дикого типа или генотипирование геномной ДНК для аллелей в локусе D14, например, амплификацию всей или части последовательности гена или кДНК (мРНК) с

использованием, например, праймеров для ПЦР, или секвенирование геномной области (например, генотипирование путем секвенирования) и сравнение последовательностей аллеля D14 с последовательностями дикого типа.

Способ получения мутантов включает, например, мутагенизацию одного или более семян, растений или частей растений арбуза, огурца или дыни (с использованием, например, радиации или химических мутагенных агентов) или создание популяции мутагенизированных растений и скрининг M1 или M2 или дальнейшее создание для присутствия мутантных аллелей D14. Затем растение, содержащее мутантный аллель, можно сделать гомозиготным по мутантному аллелю для анализа фенотипа.

В одном аспекте мутантный аллель *CID14*, *CsD14* или *CmD14* включает мутацию в геномной ДНК, приводящую к экспрессии мутантного белка D14, содержащего одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, удаленных или замененных согласно описанию в других разделах настоящего документа, например, дубликация аминокислот с 94 по 101 SEQ ID NO: 2, 8 или 9 (или эквивалентной аминокислоты в последовательности, имеющей, по меньшей мере, 95% идентичности с SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2, 8 или 9).

Таким образом, любой мутантный аллель гена *CID14*, *CsD14* или *CmD14*, вызывающий развитие, по меньшей мере, (значительно) более высокого среднего количества вторичных ветвей в гомозиготной форме, является вариантом осуществления изобретения. Такие мутантные аллели *CID14*, *CsD14* или *CmD14* могут без особых усилий быть созданы специалистом. Специалист в данной области может, например, создать мутанты в гене *CID14*, *CsD14* или *CmD14* и определить, приводит ли их наличие к, по меньшей мере, более высокому среднему числу вторичных ветвей в гомозиготной форме у диплоидного растения по сравнению, например, с диплоидным растением, которое является гомозиготным по аллелю дикого типа. Специалист в данной области может также создать мутанты, которые кодируют нефункциональный белок, причем такие растения могут, например, использоваться для сравнения. Таким образом, новые мутанты можно сравнивать с фенотипом ветвления дикого типа и фенотипом «полного множественного ветвления», чтобы определить, имеет ли место в результате появления мутантного аллеля, например, «промежуточное множественное ветвление» или «полное множественное ветвление». Предпочтительно сравнивать

фенотип мутантных аллелей в одной и той же генетической фоновой линии, например, в немутагенизированной линии (контрольный, дикого типа) и предпочтительно также в мутантной линии, имеющей полного фенотип множественного ветвления в той же фоновой линии. Таким образом, фенотипы с самым слабым и с самым сильным ветвлением находятся в одном и том же фоне, и любые новые мутанты можно сравнивать и позиционировать в самом широком диапазоне.

После идентификации нуклеотидной последовательности гена специалист в данной области может получить растения арбуза, огурца или дыни, содержащее мутанты в гене *D14*, с помощью различных способов, например, мутагенеза, TILLING или CRISPR-Cas или других способов, известных специалистам в данной области. Специалист в данной области может выполнять целевые мутации, особенно с помощью технологий целевой модификации генов, таких как Crispr-Cas, TALENS и других. Специалист в данной области может затем подтвердить фенотип растения, гомозиготного по мутантному аллелю *D14*, т.е. развивающего более высокое среднее количество вторичных ветвей. Таким образом, специалист в данной области не ограничен конкретными мутантами *D14*, которые описаны в настоящем документе, а может в равной степени генерировать другие мутации в аллеле *D14* арбуза, огурца или дыни и тем самым создавать другие мутанты, наличие которых приводит к множественному ветвлению 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 *D14* дикого типа, присутствующего в клетке или растении. В качестве альтернативы, могут возникать мутации, которые приводят к снижению или потере функции белка *D14*, т.е. мутации (такие как миссенс-мутации или мутации сдвига рамки считывания), которые приводят к замене, вставке, дубликации и/или удалению одной или более аминокислот или при которых белок усекается за счет введения преждевременного стоп-кодона в кодирующую последовательность (нонсенс-мутации).

Поскольку белок *D14* содержит консервативные аминокислоты каталитической триады, на него в одном аспекте распространяется действие настоящего документа в силу того, что одна или несколько аминокислот

каталитической триады или содержащие аминокислоту каталитической триады заменяются, удаляются, дублируются и/или вставляются, поскольку такие мутации с большой долей вероятности приведут к потере функции.

Приводит ли какая-либо мутация в аллеле D14 к ожидаемому фенотипу, можно далее проверить путем создания гомозиготных по этой мутации растений, выращивания линии растений рядом с линией растений дикого типа и анализа фенотипов обеих линий, например, фенотипа с множественным ветвлением.

В качестве альтернативы, специалист в данной области может реализовать способ получения культурного растения арбуза, огурца или дыни, способного давать увеличенное среднее количество вторичных ветвей (множественное ветвление), и/или способ получения растений арбуза, огурца или дыни, содержащих мутантные аллели *D14*, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений, частей растений или семян арбуза, огурца или дыни, особенно культурных растений; или предоставление популяции мутированных растений или ее потомства;
- b) селекцию растения, развивающего при выращивании увеличенное среднее число второстепенных ветвей;
- c) при необходимости, определение наличия в растении, которое было отобрано в пункте b), мутантного аллеля гена *D14*; и
- d) при необходимости, выращивание растений, полученных на этапе c).

Этапы b) и c) также можно поменять местами, чтобы на этапе b) производилась селекция растения, содержащего мутантный аллель гена D14, а на этапе c) при необходимости, определялось, обеспечивает ли это растение (или его потомство) фенотип с увеличенным средним вторичным ветвлением / множественным ветвлением.

Этап a) может осуществляться, например, путем мутагенизации семян одной или более линий или сортов арбуза, огурца или дыни, 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, перед проведением этапа b) популяция мутагенизированных растений подвергается

самоопылению, по меньшей мере, один раз (например, для получения поколения M2 или M3, M4 и т.д.).

Фенотипирование этапа b) легко выполняется визуально, например, путем подсчета вторичных ветвей.

Такие растения или их потомство можно проверить на наличие мутантного гена *D14* с помощью фенотипического анализа (например, вторичного ветвления) и/или генотипирования растений на наличие мутаций в гене *D14* и кодируемого белка или экспрессии гена *D14*, секвенирования и других способов, которые известны специалистам. Таким образом, существуют различные методы или сочетания методов для проверки наличия мутантного аллеля гена *D14* в фенотипически отобранном растении.

Если этап b) представляет собой селекцию растений, содержащих мутантный аллель гена *D14*, то специалист в данной области также может использовать различные методы обнаружения ДНК, мРНК или белка гена *D14*, чтобы идентифицировать растение, содержащее мутантный аллель *D14*. Геномная ДНК гена *CID14* арбуза дикого типа, кодирующая функциональный белок CID14 (SEQ ID NO: 2), представляет собой ДНК SEQ ID NO: 6, а кДНК (мРНК), кодирующая белок SEQ ID NO: 2, предоставлена в SEQ ID NO: 4. Промотор находится ранее в цепи до этой последовательности и, например, может быть получен путем секвенирования или из базы данных геномов арбуза. Например, по меньшей мере, 1000 или, по меньшей мере, 2000 оснований ранее в цепи до старта АТГ включают последовательность промотора.

Геномная ДНК гена *CsD14* огурца дикого типа, кодирующая функциональный белок *CsD14* (SEQ ID NO: 8), представляет собой ДНК SEQ ID NO: 15, а кДНК (мРНК), кодирующая белок SEQ ID NO: 8, предоставлена в SEQ ID NO: 17. Промотор находится ранее в цепи до этой последовательности и, например, может быть получен путем секвенирования или из базы данных геномов огурца. Например, по меньшей мере, 1000 или, по меньшей мере, 2000 оснований ранее в цепи до старта АТГ включают последовательность промотора.

Геномная ДНК гена *CmD14* дыни дикого типа, кодирующая функциональный белок CmD14 (SEQ ID NO: 9), представляет собой ДНК SEQ ID NO: 16, а кДНК (мРНК), кодирующая белок SEQ ID NO: 9, предоставлена в SEQ

ID NO: 18. Промотор находится ранее в цепи до этой последовательности и, например, может быть получен путем секвенирования или из базы данных геномов огурца. Например, по меньшей мере, 1000 или, по меньшей мере, 2000 оснований ранее в цепи до старта АТГ включают последовательность промотора.

В одном аспекте мутантный аллель гена *D14* представляет собой мутантный аллель, приводящий к снижению или отсутствию экспрессии гена *D14*, или мутантный аллель, приводящий к замене, вставке или удалению одной или более аминокислот кодируемого белка D14, по сравнению с белком D14 дикого типа.

В одном аспекте мутантный аллель гена *D14* 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 селекции растений, например, из потомства, включающего мутантный аллель *D14*. В одном аспекте выбирается аллель, включающая мутацию в кодоне или же вставку, делецию или дупликацию одного или более кодонов, например, одного или более кодонов, кодирующих аминокислоты с 94 по 101 SEQ ID NO: 2, 8 или 9. В одном аспекте наличие мутантного аллеля вызывает укорочение кодируемого белка D14 арбуза, огурца или дыни.

В одном аспекте ИДП-маркер (маркер mWM23349015_k2) обнаруживается в геноме растения арбуза или части растения, или в ДНК из него. Данный ИДП-маркер описан в примерах и обнаруживает инсерционный аллель (содержащий 24 нуклеотида, вставленных/дублированных, что приводит к дупликации 8 аминокислот) и/или аллель дикого типа в арбузе.

Следует отметить, что ссылка на ИДП-маркер mWM23349015_k2 не ограничивается конкретными прямыми и обратными праймерами для ПЦР, представленными в настоящем документе, а относится к любому биаллельному маркеру, который может различать аллель *CID14* дикого типа SEQ ID NO: 6 и мутантный аллель *CID14* SEQ ID NO: 5 (содержащий 24 дублированных/вставленных нуклеотида). Специалист в данной области может легко создать другие аллель-специфические праймеры или аллель-специфические зонды для использования в качестве биаллельного маркера с целью обнаружения генотипов для этих двух аллелей *CID14*.

В одном ИДП-маркер (маркер mWM23349015_k2) обнаруживается в геноме растения арбуза или части растения, либо в геномной ДНК или кДНК из него. Соответственно, в настоящем документе предложен способ обнаружения присутствия вставки из 24 нуклеотидов. Таким образом, геномную ДНК или кДНК/мРНК арбуза можно проверить на наличие в ней аллеля *CID14* дикого типа и/или инсерционного аллеля и, при необходимости, можно отобрать ее.

В другом аспекте ОНП, который обеспечивает замену одной аминокислоты другой аминокислотой или стоп-кодоном, как показано в Таблице А или Таблице 2, наблюдается в геноме растения арбуза или его части, или в ДНК из него. Соответственно, в настоящем документе предусмотрен способ обнаружения присутствия любого из этих ОНП. Таким образом, геномную ДНК или кДНК/мРНК арбуза можно проверить на наличие в ней аллеля *CID14* дикого типа и/или мутантного аллеля из таблицы А или таблицы 2 и, при необходимости, можно отобрать ее.

Для других мутантных аллелей *D14* арбуза, огурца или дыни можно легко разработать анализы маркеры INDEL или ОНП (или другие маркеры) и анализы генотипирования ИДП или ОНП (или другие виды генотипирования). Таким образом, настоящим документом охвачены аллель-специфичные маркеры и способы обнаружения, особенно для любого мутантного аллеля, наличие которого приводит к вставке, дупликации, удалению или замене аминокислоты белка D14 арбуза, огурца или дыни.

Особенно в одном аспекте генотип ИДП-маркера (например, маркер mWM23349015_k2) может быть определен и использован для селекции растений или растений-потомков, содержащих аллель дикого типа SEQ ID NO: 6 и/или мутантный аллель *CID14* SEQ ID NO: 5.

Диплоидное растение, которое является гетерозиготным по мутантному аллелю *CID14*, будет содержать в геноме как SEQ ID NO: 5, так и SEQ ID NO: 6. Диплоидное растение, которое является гомозиготным по мутантному аллелю *CID14*, будет содержать только SEQ ID NO: 5 в локусе хромосомы 8. А диплоидное растение, которое является гомозиготным по аллелю дикого типа, будет содержать в геноме только SEQ ID NO: 6.

Как уже упоминалось ранее, маркеры, специфичные для мутантного аллеля, и маркерные анализы могут одинаково легко разрабатываться для любого мутантного аллеля *D14*, поскольку лежащее в основе геномное изменение, например, в кодоне, может использоваться для разработки маркерного анализа с целью обнаружения геномных изменений, например, лежащих в основе аминокислотных изменений, описание которых приводится в настоящем документе, или других геномных изменений в мутантном аллеле *D14* по сравнению с аллелем *D14* дикого типа.

С использованием таких аллель-специфичных маркеров, которые выявляют специфические мутантные аллели *D14*, генотипирование может проводиться для обнаружения присутствия и количества копий аллеля в растениях и растительном материале (или полученной из них ДНК).

Что касается вариантов осуществления изобретения, мутация в мутантном аллеле гена *D14*, может быть представлена любой мутацией, включая удаления, 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 в мутантном аллеле гена *D14* является точечной. Мутация может происходить в последовательности ДНК, содержащей кодирующую последовательность гена *D14*, или в последовательности РНК, кодирующей белок *D14*, или же она может происходить в аминокислоте белка *D14*. Что касается последовательности ДНК гена, кодирующего белок *D14*, мутация может происходить в кодирующей последовательности или в некодирующих последовательностях, таких как 5'- и 3'-нетранслируемые области, промоторы, энхансеры и т.д. гена *D14*. Что касается РНК, кодирующей белок *D14*, мутация может происходить в пре-мРНК или мРНК. В одном аспекте наличие мутантного аллеля приводит к потере или снижению функции белка из-за замены, вставки, дубликации и/или удалению одной или более аминокислот, что, например, приводит к замене, вставке, дубликации и/или удалению одной или более аминокислот на С-концевой области белка, в домене IPR000073, в домене спиральной крышки или содержит одну из аминокислот каталитической триады.

Следовательно, один из вариантов осуществления изобретения касается растительных клеток или растений по изобретению, содержащих мутантный

аллель гена D14, и характеризующегося тем, что мутантный аллель содержит или оказывает влияние на одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из следующего:

- a) удаление, усечение, вставка, точечная мутация, нонсенс-мутация, миссенс- или несинонимическая мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация сдвига рамки считывания в геномной последовательности;
- b) мутация в одной или более регуляторных последовательностях;
- c) удаление, усечение, вставка, точечная мутация, нонсенс-мутация, миссенс- или несинонимическая мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация сдвига рамки считывания в кодирующей последовательности;
- d) удаление, усечение, вставка, точечная мутация, нонсенс-мутация, миссенс- или несинонимическая мутация, мутация сайта сплайсинга, мутация сдвига рамки считывания в пре-мРНК или мРНК; и/или
- e) удаление, усечение, вставка, дупликация или замена одной или более аминокислот в белке D14.

В одном аспекте наличие мутантного аллеля приводит к снижению или отсутствию экспрессии гена D14, или же мутантный аллель кодирует белок с пониженной функцией или с потерей функции. В частности, наличие мутантного аллеля в гомозиготной форме приводит к значительному увеличению среднего числа вторичных ветвей у растения, которое является гомозиготным по мутантному аллелю, по сравнению с контрольным растением, которое является гомозиготным по аллелю дикого типа. Значительное увеличение среднего вторичного ветвления представляет собой «полное множественное ветвление», когда является нокаутным или продуцирует белок с потерей функции, либо «промежуточное множественное ветвление», когда аллель является нокаутным или продуцирует белок с пониженной функцией.

Снижение экспрессии (нокдаун-аллель) или отсутствие экспрессии (нокаутный аллель) означает, что существует мутация в регуляторной области гена D14, такой как промотор, в результате чего снижается или отсутствует транскрипт мРНК аллеля D14 по сравнению с растениями и частями растений, содержащими аллель *D14* дикого типа. Снижение экспрессии можно, например, определить путем измерения количества транскриптов мРНК, кодирующих белок D14, 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 D14 дикого типа. Экспрессию можно анализировать, например, в ткани цветка или листа.

В одном аспекте белок включает одну или более аминокислот, замененных, вставленных, дублированных или удаленных по сравнению с белком дикого типа. Таким образом, в арбузе, огурце или дыне одна или несколько аминокислот вставлены, удалены или заменены по сравнению с белком D14 дикого типа с SEQ ID NO: 2, 8 или 9 или белком D14 дикого типа, содержащим, по меньшей мере, 95%, 96 %, 97%, или 98%, или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 8 или 9; причем мутантный белок имеет пониженную функцию или утрачивает функции по сравнению с белком дикого типа, в результате чего происходит (промежуточное или сильное) множественное ветвление, когда в диплоидном растении мутантный аллель присутствует в гомозиготной форме.

Мутантные аллели вышеуказанных аллелей дикого типа в одном аспекте представляют собой мутантные аллели, имеющие пониженную экспрессию или утратившие экспрессию (например, посредством мутаций в промоторе или энхансерных элементах) или продуцирующие мутантный белок, который содержит одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, удаленных или замененных по сравнению с белком дикого типа, причем мутантный белок с пониженной функцией или при отсутствии у него функции в условиях *in vivo*, что можно определить, когда мутантный аллель находится в растении в гомозиготной форме, а также путем анализа фенотипа растения, которое является гомозиготным по мутантному аллелю, 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, и/или с контрольным растением, содержащим мутантный аллель, кодирующий нефункциональный белок (такой как, например, *CID14ins* или W155*, или те же мутанты в белках D14 огурца или дыни).

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.

Арбуз может быть представлен любым сортом арбуза. В одном аспекте растение арбуза, содержащее одну или две копии мутантного аллеля *CID14*, например, мутантного аллеля, кодирующего белок SEQ ID NO: 1, или другого мутантного аллеля, не является растением-опылителем, т.е. оно не подходит в качестве опылителя для производящего плоды триплоида, например, потому, что время цветения не синхронизировано с триплоидным цветением и/или объем производимой пыльцы недостаточно велик, чтобы его можно было использовать в качестве производителя пыльцы. В одном аспекте он используется для производства фруктов, а не для производства пыльцы. Таким образом, его не пересаживают (и оно не подходит для пересадки) с триплоидными растениями, а выращивают отдельно для получения плодов путем самоопыления. Полученные после самоопыления плоды также не являются «непригодными для сбора» с розовой или белой мякотью и низким показателем Брикса, а как раз хорошо подходят для сбора и потребления (т.е. имеют высокий Брикс, красную мякоть плода и т.д.).

Растения арбуза и их части, которые содержат, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *D14*, могут быть диплоидными, тетраплоидными или триплоидными. Диплоидное растение может быть гетерозиготным или гомозиготным по мутантному аллелю, например, по мутантному аллелю, кодирующему белок SEQ ID NO: 1 или любой другой описанный мутантный аллель. В одном аспекте диплоидное растение, содержащее мутантный аллель *D14* в гомозиготной форме, представляет собой двойное гаплоидное растение (DH),

например двойное гаплоидное растение арбуза, огурца или дыни, или растительную клетку, или часть растения.

Триплоидное растение арбуза может иметь одну, две или три копии мутантного аллеля *CID14*. Триплоидное растение с одной копией мутантного аллеля можно получить путем скрещивания женского тетраплоида дикого типа (с 4 копиями дикого типа) с диплоидным мужским, которое является гомозиготным по мутантному аллелю. Триплоидное растение с двумя мутантными аллелями можно получить путем скрещивания женского тетраплоида, содержащего четыре копии мутантного аллеля, с диплоидным мужским, которое является гомозиготным по аллелю дикого типа.

Тетраплоидное растение арбуза может иметь одну, две, три или четыре копии мутантного аллеля *CID14*. Генотипы, содержащие две копии мутантного аллеля, можно получить путем удвоения хромосом диплоида, который является гетерозиготным по мутантному аллелю. Генотипы, содержащие четыре копии мутантного аллеля, можно получить путем удвоения хромосом диплоида, который является гетерозиготным по мутантному аллелю.

Растения арбуза, огурца или дыни, которые охватываются настоящим изобретением, также можно воспроизвести вегетативно (клонально), и такие вегетативно размножаемые растения или «растения вегетативного размножения» являются вариантом осуществления изобретения. Их можно легко отличить от других растений по наличию мутантного аллеля *D14* и/или фенотипически (при необходимости, после самоопыления). Наличие одного или более мутантных аллелей *D14* можно определить в соответствии с описанием в настоящем документе.

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.

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 аспекте такая культура клеток или тканей

включает или состоит из вегетативных клеток или вегетативных тканей растения по изобретению.

В другом аспекте культура клеток или тканей включает или состоит из репродуктивных клеток или тканей, таких как пыльники, пыльца, микроспоры или семечки 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, семечки, 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 аспекте изобретения предусмотрена культура клеток или культура ткани клеток растения, содержащая одну или две копии мутантного аллеля *D14* 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 *D14* 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, огурца или дыни регенерированное из такой культуры клеток или культуры ткани, причем такое регенерированное растение (или его потомство, например, полученное после скрещивания или самоопыления регенерированного растения) содержит мутантный аллель *D14*. Поэтому в одном аспекте растение арбуза, огурца или дыни, содержащее мутантный аллель *D14* в одной или более копиях, представляет собой вегетативно размножаемое растение.

В другом аспекте клетки и ткани по изобретению (а, при необходимости, также и культура клеток или тканей), содержащие мутантный аллель *D14* одной или более копиях, представляют собой неразмножающиеся клетки или ткани.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СПОСОБЫ

Также предусмотрен способ получения растения арбуза, огурца или дыни, способного давать увеличенное среднее количество вторичных ветвей, или способ получения мутантных аллелей гена *D14*, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений арбуза, огурца или дыни или создание мутантной популяции растений арбуза, огурца или дыни; или предоставление растений арбуза, огурца или дыни, содержащих случайно или целенаправленно индуцированные мутации в целевом гене *D14*,
- b) селекцию растения, содержащего мутантный аллель гена *D14*;
- c) при необходимости, проверку того, дает ли выбранное в пункте b) растение увеличенное среднее количество вторичных ветвей, когда мутантный аллель *D14* находится в гомозиготной форме, по сравнению с контрольным растением, которое содержит аллели гена *D14* дикого типа.

Также предусмотрен способ получения растения арбуза, огурца или дыни, способного обеспечивать фенотип множественного ветвления, или способ получения мутантных аллелей гена *D14*, который обеспечивает фенотип с полным множественным ветвлением при нахождении растения в гомозиготной форме, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений арбуза, огурца или дыни или создание мутантной популяции растений арбуза, огурца или дыни; или предоставление растений арбуза, огурца или дыни, содержащих случайно или целенаправленно индуцированные мутации в целевом гене *D14*,
- b) селекцию растения, содержащего мутантный аллель гена *D14*, причем мутантный аллель *D14* является нокаутным, или же представлен аллелем, который кодирует белок *D14* с потерей функции;

- c) при необходимости, проверку того, дает ли выбранное в пункте b) растение увеличенное среднее количество вторичных ветвей, когда мутантный аллель *D14* находится в гомозиготной форме, по сравнению с контрольным растением, которое содержит аллели гена *D14* дикого типа.

Также предусмотрен способ получения растения арбуза, огурца или дыни, способного продуцировать фенотип с промежуточным множественным ветвлением, или способ получения мутантных аллелей гена *D14*, которые обеспечивают фенотип с промежуточным множественным ветвлением у растения в гомозиготной форме, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений арбуза, огурца или дыни или создание мутантной популяции растений арбуза, огурца или дыни; или предоставление растений арбуза, огурца или дыни, содержащих случайно или целенаправленно индуцированные мутации в целевом гене *D14*,
- b) селекцию растения, содержащего мутантный аллель гена *D14*, причем мутантный аллель *D14* является нокдаун-аллелем, или же представлен аллелем, который кодирует белок *D14* с пониженной функцией;
- c) при необходимости, проверку того, дает ли выбранное в пункте b) растение увеличенное среднее количество вторичных ветвей, когда мутантный аллель *D14* находится в гомозиготной форме, по сравнению с контрольным растением, которое содержит аллели гена *D14* дикого типа.

Растение арбуза, огурца или дыни содержащее, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля *D14*, полученную вышеуказанным способом, и/или же сюда включается мутантный аллель *D14*, индуцированный и идентифицированный вышеуказанным способом. В одном аспекте растение арбуза, полученное вышеуказанным способом и содержащее мутантный аллель, обеспечивающий полное множественное ветвление в гомозиготной форме, не содержит мутантного аллеля SEQ ID NO: 5. В другом аспекте растение арбуза, полученное вышеуказанным способом и содержащее мутантный аллель, который обеспечивает полное множественное ветвление в гомозиготной форме, находится на иной фоновой линии происхождения арбуза по сравнению с сортом Sidekick, и

отличается по одной или нескольким характеристикам от сорта Sidekick, если оно кодирует то же самый белок, кодируемый опылителем Sidekick (белок CID14ins, показанный в SEQ ID NO: 1). Например, оно может отличаться от Sidekick тем, что не подходит в качестве опылителя и/или дает плоды с красной мякотью, и/или имеет более высокий средний вес плода, или другими характеристиками, которые отличают растение от сорта Sidekick.

Популяция растений арбуза согласно пункту а) 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, огурца или дыни, которая была подвергнута целевой модификации генов с использованием, например, методов на основе Crispr.

На этапе b) селекция растения, содержащего мутантный аллель гена *D14*, может выполняться фенотипически и/или путем скрининга растений (или частей растений или их ДНК) на наличие мутантного аллеля гена *D14*, т.е. аллель, который либо имеет пониженную экспрессию (в случае с нокдаун-аллелем), либо не имеет экспрессии (в случае с нокаутным аллелем) аллеля *D14* дикого типа или аллеля, кодирующего мутантный белок *D14*.

Что касается скрининга на предмет фенотипа, очевидно, что их можно отобрать только в том случае, если мутантный аллель *D14* находится в гомозиготной форме, и если мутантный аллель имеет пониженную экспрессию или не экспрессируется, или же кодирует белок с пониженной или утраченной функцией, в результате чего наблюдается фенотип. Скрининг на фенотип или комбинацию фенотипов можно проводить согласно описанию, например, за счет выращивания линии, содержащей мутантный аллель *D14* в гомозиготной форме, в тех же условиях выращивания, что и контрольная линия или сорт, содержащий аллель *D14* дикого типа в гомозиготной форме, а затем за счет анализа вторичного ветвления.

Относительно скрининга или селекции растений на предмет наличия мутантного аллеля гена *D14*, это можно сделать различными методами, которые позволяют обнаружить ДНК, РНК или белок *D14*, 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 *D14*, можно использовать различные методы. Например, можно провести маркерный анализ или анализ последовательности аллеля или хромосомной области, содержащей локус *D14*, или можно использовать ПЦР или ПЦР с обратной транскрипцией для амплификации аллеля *D14* (или его части) или мРНК (кДНК), или можно выполнить секвенирование. Также можно провести генетический анализ для оценки рецессивного наследования. Таким образом, аллель можно, например, секвенировать (например, его геномную ДНК или кДНК), чтобы определить, какая мутация присутствует в нем. На этапе b) также можно использовать анализ Provean и/или SIFT для селекции растения, имеющего мутантный аллель, который согласно прогнозам будет понижать или отменять функцию белка *D14*. См. примеры.

Если использовались методы редактирования гена, вектор/конструкт, введенный в растение для индукции мутаций в аллеле, предпочтительно удаляют из линии растений, содержащей мутантный аллель *D14*, чтобы линия растений не содержала такого вектора или конструкта.

В одном аспекте растения не содержат генетического конструкта, вставленного в геном путем трансформации.

В одном аспекте мутантные аллели создаются путем мутагенеза (например, химического или радиационного мутагенеза) или целевого мутагенеза, особенно с использованием системы CRISPR (например, *Crispr/ Cas9* или *Crispr/ Cpf1*, или других нуклеаз). В одном аспекте культивируемое растение, содержащее мутантный аллель *D14*, не является трансгенным, т.е. отбирается нетрансгенное потомство, которое не содержит, например, конструкты CRISPR.

В одном аспекте мутантный аллель гена *D14* включает мутацию, индуцированную человеком, т.е. мутацию, введенную методами мутагенеза,

такими как химический мутагенез или радиационный мутагенез, или методами направленного мутагенеза, такими как методы на основе Crispr.

В настоящем документе предусмотрен способ целевого мутагенеза эндогенного гена D14 в арбузе, огурце или дыне 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 аспекте предложен изолированный мутантный белок D14 и изолированный белок D14 дикого типа или выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая мутантный белок D14 или белок D14 дикого типа. Также сюда включено антитело, способное связывать мутантный белок D14 или белок D14 дикого типа. Выделенный мутантный белок в одном аспекте представляет собой белок SEQ ID NO: 1, содержащий дубликацию 8 аминокислот, но также может представлять собой и изолированный белок любого другого мутантного аллеля D14, описание которого приводится в настоящем документе. В одном аспекте выделенный мутантный белок представляет собой белок, описание которого приведено в Таблице А или Таблице 2. В одном аспекте выделенная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК или РНК, кодирующую мутантный белок, описание которого приведено в Таблице А или Таблице 2.

В еще одном аспекте охватываются фрагменты нуклеотидных последовательностей или молекул нуклеиновой кислоты, представленных в настоящем документе (и/или комплементарная цепь последовательностей или молекул), поскольку их можно использовать в качестве праймеров или зондов для ПЦР с целью обнаружения последовательностей в образцах ДНК или РНК. Фрагменты включают, например, участки, по меньшей мере, из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65 или более нуклеотидов геномных последовательностей SEQ ID NO: 5 или 6, SEQ ID NO: 13 или 14, SEQ ID NO: 15 или 16, SEQ ID NO: 10, 11 или 12, или комплементарную цепь или обратную комплементарную цепь любого из них, или последовательности мРНК или кДНК, или молекулы SEQ ID NO: 3 или 4, или SEQ ID NO: 17 или 18, или комплементарную цепь или обратную комплементарную цепь любого из них. Также включены фрагменты выделенных молекул нуклеиновой кислоты или последовательностей (ДНК или РНК), кодирующих мутантный белок, описанный в Таблице А или Таблице 2.

СПОСОБЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

В одном аспекте предусмотрен способ скрининга для идентификации и/или селекции семян, растений или частей растений или ДНК из указанных семян, растений или частей растений, содержащих в своем геноме мутантный аллель и/или аллель дикого типа гена, кодирующего белок D14.

Способ предусматривает скрининг на уровне ДНК (особенно геномной ДНК), РНК (или кДНК) или белка с использованием известных способов с целью обнаружения присутствия мутантного аллеля и/или аллеля дикого типа. Существует множество методов обнаружения присутствия мутантного и/или аллеля гена дикого типа.

Таким образом, способ скрининга и/или селекции растений или растительного материала или частей растений, или ДНК, или РНК, или белка, полученного из них, на наличие мутантного аллеля *D14* и/или аллеля дикого типа *D14* включает в себя один или более следующих этапов:

- a) определение экспрессии эндогенного гена D14 для того, чтобы, например, можно было определить, редуцирован он или удален;
- b) определение количества белка D14 дикого типа для того, чтобы, например, можно было определить, редуцирован он или удален;
- c) определение наличия мутантной мРНК и/или мРНК дикого типа, кДНК или геномной ДНК, кодирующей мутантный белок D14 или белок D14 дикого типа;
- d) определение наличия мутантного белка D14 и/или белка D14 дикого типа;
- e) определение того, демонстрируют ли растения или их потомство мутантный фенотип (как указано выше, например, сильное ветвление или умеренное ветвление) или фенотип дикого типа (нормальное ветвление).

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

Растения или растительный материал или части растений могут представлять собой растения арбуза, огурца или дыни, или растительный материал, или части растений, такие как листья, части листьев, клетки, плоды, части плодов, завязи, стебель, гипокотиль, семя, части семян, семенные оболочки, эмбрион и т.д.

Например, если между аллелем дикого типа и мутантным аллелем существует однонуклеотидное различие (однонуклеотидный полиморфизм, ОНП, или инсерционно-делеционный полиморфизм, ИДП), для того чтобы определить, содержит ли растение или часть растения или клетка нуклеотид (или нуклеотиды) дикого типа или мутантный нуклеотид (или нуклеотиды) в своем геноме, можно использовать анализ генотипирования ОНП или ИДП. Например, ОНП или ИДП без труда обнаруживаются с помощью KASP-анализа (см. kpbioscience.co.uk) или других видов анализа генотипирования, особенно биаллельного генотипирования. Для проведения KASP-анализа можно выбрать, например, порядка 70 пар оснований выше и порядка 70 пар оснований ниже ОНП или ИДП, а также можно сконструировать два аллель-специфичных прямых праймера и один обратный праймер. Для более подробного описания методик KASP-анализа см., например, Allen *et al.* 2011, *Plant Biotechnology J.* 9, 1086-1099, особенно стр. 097-1098.

Также можно использовать и другие способы генотипирования. Например, генотипирование ОНП TaqMan, анализ кривых плавления с высоким разрешением (HRM), массивы генотипирования ОНП, например, в одинаковой степени можно использовать микрочипы (например, Fluidigm, Illumina и т.д.) или секвенирование ДНК (например, генотипирование путем секвенирования).

Таким образом, на основе разницы между геномной последовательностью аллели дикого типа и мутантной аллели специалист в данной области техники может легко разработать маркеры или методики анализа, которые можно использовать для обнаружения конкретных аллелей.

Настоящей заявкой также предусмотрен способ идентификации растения арбуза, огурца или дыни (или части растения), содержащего мутантный аллель *D14*, причем данный способ предусматривает обнаружение в растении (или части растения) присутствия мутантного аллеля *D14*, а также причем присутствие обнаруживается, по меньшей мере, одним маркером (например, маркером ОНП или маркером ИДП) в рамках аллеля *D14* или путем обнаружения белка, кодируемого

аллелем *D14*. Способ обнаружения мутантного аллеля *D14* выбран из группы, состоящей из способов, к которым относятся ПЦР-амплификация, секвенирование нуклеиновых кислот, гибридизация нуклеиновых кислот и анализ на основе антител (например, иммуноанализ) для обнаружения белка D14, кодируемого аллелем.

Настоящей заявкой также предусмотрен способ идентификации растения арбуза, огурца или дыни (или части растения), содержащего мутантный аллель *D14*, имеющий мутацию в регуляторном элементе, причем способ предусматривает обнаружение в растении (или части растения) сниженной экспрессии гена или отсутствия экспрессии гена мутантного аллеля *D14*, присутствие которого определяют по уровням мРНК (кДНК) аллеля *D14* дикого типа или путем определения уровней белка D14 дикого типа. Способ обнаружения мутантного аллеля *D14* выбирают из группы, которая включает в себя ПЦР-амплификацию (например, ОТ-ПЦР), секвенирование нуклеиновых кислот, вестерн-блоттинг и анализ на основе антител (например, иммуноанализ) для обнаружения белка D14, кодируемого аллелем.

Настоящим документом также предусмотрен способ определения, обнаружения или анализа того, содержит ли клетка растения или части растения арбуза, огурца или дыни мутантный аллель гена D14, кодирующего белок SEQ ID NO: 2, 8 или 9 или белок, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 9. В одном аспекте способ включает определение экспрессии аллеля и/или определение кодирующей последовательности аллеля, и/или определение части кодирующей последовательности аллеля (например, генотипа ОНП или ИДП аллеля), и/или определение аминокислотной последовательности вырабатываемого белка и/или количества вырабатываемого белка.

Для определения наличия в растении или его части мутантного аллеля *D14* по изобретению, можно использовать различные методы. Как указывалось выше, можно определить уровень мРНК (или кДНК) аллеля дикого типа или уровень белка дикого типа с тем, чтобы посмотреть, имеется ли сниженная экспрессия или отсутствие экспрессии аллеля 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, генотипирование ОНП или ИДП, может позволить отличить присутствие мутантного аллеля от аллеля дикого типа, например, генотипирование по маркеру mWM23349015_k2 (см. «Примеры») или генотипирование по любому из мутантных аллелей, указанным в Таблице А или Таблице 2, или другим мутантным аллелям.

Способ селекции растения, включающий следующие этапы:

- a) идентификацию растения, которое имеет мутацию в аллеле, кодирующем ген, кодирующий белок D14, причем аллель гена дикого типа кодирует белок D14, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен последовательности с любым из белков, выбранных из группы: SEQ ID NO: 2, 8 или 9, а также, при необходимости,
- b) определение того, дает ли растение или растение-потомок фенотип с множественным ветвлением, а также, при необходимости,
- c) селекцию растения, содержащего, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля, полученного на этапе a).

Способ получения растения, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений или создание популяции мутировавших растений (например, популяции, полученной с использованием TILLING-подхода),
- b) селекцию растения, дающего фенотип с множественным ветвлением и/или содержащего мутантный аллель *D14*,
- c) при необходимости, проверку того, имеет ли растение, селектированное в пункте b), мутацию в аллеле, кодирующем ген, кодирующий белок D14, а также селекцию растения, содержащего такую мутацию, а также, при необходимости,
- d) выращивание/культивирование растений, полученных согласно пункту c),

причем аллель гена дикого типа кодирует белок D14, последовательность которого, по меньшей мере, на 95% идентична белку: SEQ ID NO: 2, 8 или 9.

Способ селекции растения, обладающего сильно ветвящимся фенотипом или промежуточным сильно ветвящимся фенотипом, включающий следующие этапы:

- a) скрининг растений (или ДНК из них) на наличие мутантных аллелей гена D14, причем аллель гена дикого типа кодирует белок D14, который, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, <99% или 100 % идентичен последовательности любого из белков, выбранных из группы: SEQ ID NO: 2, 8 или 9, а также
- b) селекцию растения, содержащего мутантный аллель, который либо i) представляет собой нокаутный аллель, либо кодирует нефункциональный белок D14, при этом данный аллель в гомозиготной форме дает фенотип с сильным множественным ветвлением, или ii) представляет собой нокаун-аллель или кодирует восстановленный -функциональный белок D14, аллель которого в гомозиготной форме дает фенотип с промежуточным множественным ветвлением, а также, при необходимости,
- c) подтверждение того, что растение или растение-потомок, содержащее мутантный аллель в гомозиготной форме, дает указанный фенотип с сильным множественным ветвлением i) или указанный фенотип с промежуточным множественным ветвлением ii).

В одном аспекте этап b) включает в себя прогнозирование того, кодирует ли мутантный аллель белок D14, для которого характерна сниженная функция или ее отсутствие, например, проведение SIFT-анализа или анализа с использованием ПО Proveal для определения влияния аминокислотных замен на функцию белка. Растение или растения, содержащие аллель, который прогнозируется как «вредный» по результатам анализе с использованием ПО Proveal и/или «непереносимый» по результатам SIFT-анализа, селекционируется на этапе b).

Способ получения или селекции растения, обладающего фенотипом с сильным множественным ветвлением или фенотипом с промежуточным множественным ветвлением, включающий следующие этапы:

- a) введение мутаций в популяцию растений или создание популяции мутантных растений (например, например, популяции, полученной с использованием TILLING-подхода),
- b) селекцию растения, содержащего мутантный аллель *D14*, который либо i) представляет собой нокаутный аллель, либо кодирует нефункциональный белок D14, при этом данный аллель в гомозиготной форме дает фенотип с сильным множественным ветвлением, или ii) представляет собой нокаун-аллель или кодирует восстановленный -функциональный белок D14, аллель которого в гомозиготной форме дает фенотип с промежуточным множественным ветвлением,
- c) селекцию растения, содержащего мутантный аллель i) или ii),

причем аллель гена дикого типа кодирует белок D14, последовательность которого, по меньшей мере, на 95% идентична белку: SEQ ID NO: 2, 8 или 9.

Селектированное растение можно подвергнуть самоопылению с тем, чтобы получить растение, которое содержит мутантный аллель в гомозиготной форме, и гомозиготное растение можно выращивать для определения фенотипа.

Способ получения растения, включающий следующие этапы:

- a) введение молекулы чужеродной нуклеиновой кислоты в растение, причем молекула чужеродной нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из
 - i) молекул ДНК, которые кодируют, по меньшей мере, одну антисмысловую РНК, вызывающую снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок D14;
 - ii) молекул ДНК, которые посредством эффекта со-супрессии приводят к снижению экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок D14;
 - iii) молекул ДНК, кодирующих, по крайней мере, один рибозим, расщепляющий специфические транскрипты эндогенного гена, кодирующего белок D14;
 - iv) молекул ДНК, которые одновременно кодируют, по меньшей мере, одну антисмысловую РНК и, по меньшей мере, одну смысловую РНК, при этом указанная антисмысловая РНК и указанная смысловая РНК

образуют двухцепочечную молекулу РНК, которая вызывает снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок D14 (технология РНКи);

- v) молекул нуклеиновой кислоты, введенных *in vivo* путем мутагенеза, который приводит к мутации или вставке гетерологичной последовательности в эндогенный ген, кодирующий белок D14, при этом мутация или вставка вызывают снижение экспрессии гена, кодирующего белок D14, или приводят к синтезу белка D14, который вызывает потерю или снижение функции;
- vi) молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитело, причем антитело приводит к снижению активности эндогенного гена, кодирующего белок D14, в результате связывания антитела с эндогенным белком D14;
- vii) молекул ДНК, которые содержат транспозоны, причем интеграция таких транспозонов приводит к мутации или вставке в эндогенный ген, кодирующий белок D14, что приводит к снижению экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок D14, или приводит к синтезу неактивного белка;
- viii) молекул Т-ДНК, которые вследствие вставки в эндогенный ген, кодирующий белок D14, вызывают снижение экспрессии эндогенного гена, кодирующего белок D14, или приводят к синтезу белка D14, который вызывает потерю или снижение функции;
- ix) молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют эндонуклеазы редкого расщепления или специально разработанные эндонуклеазы редкого расщепления, предпочтительно мегануклеазу, нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции, или систему CRISPR/Cas.
- b) селекцию растения или потомства растения, причем такое растение или потомство растения дает более высокий процент мужских цветков и/или цветков со сросшимися лепестками и/или листьями, и, при необходимости,
- c) проверку того, имеет ли растение или потомство, селектированное в соответствии с пунктом b), пониженную активность белка D14 по

- сравнению с растениями дикого типа, в геном которых, например, никакие чужеродные молекулы нуклеиновой кислоты не вводились,
- d) выращивание/культивирование растений, полученных согласно пункту с).

Настоящей заявкой предусмотрено растение, полученное любым из указанных выше способов.

Одним аспектом предусмотрено генетически модифицированное растение и часть растения, причем растение имеет сниженную экспрессию или отсутствие экспрессии эндогенного гена D14, например, в результате подавления эндогенного гена D14. Таким растением может быть любое растение, в одном аспекте это арбуз, огурец или дыня.

В другом аспекте предусмотрено растение и часть растения арбуза, огурца или дыни, содержащие мутацию в эндогенном гене D14, например, индуцированную мутацию, возникшую, например, в результате направленного мутагенеза, при котором экспрессия гена снижается или отсутствует, либо экспрессируемый ген кодирует снижение или потерю функции белка D14 по сравнению с белком дикого типа.

В другом аспекте предусмотрен способ обнаружения и, необязательно, селекции растения, семени или части растения арбуза, содержащего, по меньшей мере, одну копию аллеля дикого типа и/или мутантного аллеля гена *ID14* (*Citrullus lanatus Dwarf14*), включающего в себя следующие этапы:

- a) предоставление одного или более образцов геномной ДНК одного или более растений, семян или частей растения арбуза,
- b) проведение анализа генотипирования с использованием образцов ДНК с этапа a) в качестве шаблона, позволяющего различать аллель *CID14* дикого типа и мутантный аллель *CID14*, причем указанный анализ генотипирования основан на амплификации нуклеиновой кислоты с использованием *CID14*-аллель-специфичных олигонуклеотидных праймеров, и/или тем, что указанный анализ генотипирования основан на гибридизации нуклеиновых кислот с использованием *CID14*-аллель-специфичных олигонуклеотидных зондов, и, при необходимости,

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

причем аллель дикого типа *CID14* включает в себя последовательность SEQ ID NO: 6, а мутантный аллель *CID14* содержит один или несколько нуклеотидов, вставленных, дублированных, удаленных или замененных относительно последовательности SEQ ID NO: 6.

В приведенном выше методе могут использоваться специфические для аллеля *CID14* олигонуклеотидные праймеры или указанные специфичные для аллеля *CID14* олигонуклеотидные зонды, которые содержат, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 6 или комплементарную цепь с SEQ ID NO: 6.

В одном аспекте описанного выше способа мутантный аллель содержит, 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 STOP-кодон.

В одном аспекте описанного выше способа мутантный аллель содержит последовательность SEQ ID NO: 5.

В другом аспекте описанного выше способа мутантный аллель представляет собой аллель, кодирующий белок, как описано в Таблице А или Таблице 2.

В другом аспекте описанного выше способа мутантный аллель представляет собой аллель, кодирующий белок D14, который обуславливает отсутствие функции, или белок D14, который обуславливает пониженную функцию, как описано в других разделах настоящего документа.

В одном аспекте описанного выше способа олигонуклеотидные праймеры или олигонуклеотидные зонды содержат, по меньшей мере, 15, 16, 17 или более нуклеотидов, комплементарных SEQ ID NO: 6 или комплементарной последовательности SEQ ID NO: 6.

Предпочтительно генотипирование, используемое в вышеуказанном способе, представляет собой KASP-анализ, причем указанный KASP-анализ включает в себя первый прямой праймер, позволяющий обнаружить аллель дикого типа SEQ ID NO: 6 в образце ДНК, второй прямой праймер, позволяющий

обнаружить мутантный аллель, содержащий один или более нуклеотидов, вставленных, удаленных или замененных по отношению к SEQ ID NO: 6 в образце ДНК, а также один общий обратный праймер.

В одном аспекте второй прямой праймер позволяет обнаружить мутантный аллель SEQ ID NO: 5 в образце ДНК.

В другом аспекте второй прямой праймер позволяет обнаружить мутантный аллель, который представляет собой аллель, кодирующий белок, как описано в Таблице А или Таблице 2.

В другом аспекте второй прямой праймер позволяет обнаружить мутантный аллель, который представляет собой аллель, кодирующий белок D14 с отсутствующей функцией или белок D14 с пониженной функцией, как описано в других разделах по тексту настоящей заявки.

В одном аспекте KASP-анализа первый прямой праймер содержит SEQ ID NO: 11 или комплементарную ей последовательность, и/или второй прямой праймер содержит SEQ ID NO: 10 или комплементарную ей последовательность.

Настоящей заявкой также предусмотрен синтезированный или синтетический праймер или зонд нуклеиновой кислоты, причем указанный праймер или зонд содержит, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, например, SEQ ID NO: 5 (или другой мутантный аллель), или SEQ ID NO: 6, или комплементарную последовательность любого из них. Олигонуклеотиды также можно синтезировать с использованием обычных методов синтеза олигонуклеотидов. Праймеры или зонды предпочтительно представляют собой ДНК-олигонуклеотиды и представлены, например, в буферном растворе, который будет использоваться, например, для генотипирования.

Кроме того, предусмотрен способ обнаружения и, при необходимости, селекции растения, семени или части растения арбуза, огурца или дыни, содержащего, по меньшей мере, одну копию аллеля D14 дикого типа и/или мутантного аллеля D14 гена *CID14* (*Citrullus lanatus* Dwarf14), *CsD14* (*Cucumis sativus* Dwarf14) или *CmD14* (*Cucumis melo* Dwarf14), включающий следующие этапы:

- a) получение одного или более образцов геномной ДНК одного или более растений, семян или частей растений арбуза, огурца или дыни,

- b) выполнение генотипирования с использованием образцов ДНК из пункта а) в качестве матрицы, причем в основе указанного генотипирования лежит амплификация нуклеиновой кислоты с использованием специфических для аллеля *D14* олигонуклеотидных праймеров, и/или тем, что в основе такого генотипирования лежит гибридизация нуклеиновых кислот с использованием специфических для аллеля *D14* олигонуклеотидных зондов и, при необходимости,
- с) селекцию растения, семени или части растения, содержащего одну или две копии мутантного аллеля,

причем аллель *D14* дикого типа кодирует белок SEQ ID NO: 2 (в арбузе), SEQ ID NO: 8 (в огурце) и SEQ ID NO: 9 (в дыне), а мутантный аллель *D14* содержит одну или более аминокислот, которые вставлены, делетированы или заменены применительно к SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9.

В одном аспекте мутантный аллель *D14* представляет собой аллель, кодирующий белок *D14* с отсутствующей функцией или белок *D14* с пониженной функцией, как описано в других разделах по тексту настоящего документа.

В одном аспекте способа, указанные специфические для аллеля *D14* олигонуклеотидные праймеры или указанные специфические для аллеля *D14* олигонуклеотидные зонды содержат, по меньшей мере, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16 или комплементарную цепь указанных последовательностей.

В дополнительном аспекте описанного выше способа мутантный аллель кодирует белок, содержащий дупликацию, по меньшей мере, одной аминокислоты, из числа аминокислот 94 – 101 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9. В одном аспекте мутантный аллель кодирует белок, содержащий дупликацию, по меньшей мере, серина 97 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9. В другом аспекте мутантный аллель кодирует белок, содержащий дупликацию аминокислот 94 – 101 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9.

Кроме того, предусмотрен способ селекции арбуза, включающий маркерную селекцию (MAS) с использованием маркера ИДП для селекции линий арбуза, причем указанный маркер ИДП обнаруживает в образце или образцах геномной ДНК последовательность SEQ ID NO: 6 (делеционный аллель или его

комплементарную последовательность) и/или последовательность SEQ ID NO: 5 (инсерционный аллель или его комплементарную последовательность).

Также предусмотрен способ селекции арбуза, включающий маркерную селекцию (MAS) с использованием маркера ИДП или маркера ОНП для селекции линий арбуза, причем указанный маркер ИДП или маркер ОНП обнаруживает в образце или образцах геномной ДНК аллель, который кодирует белок дикого типа SEQ ID NO: 2 и/или аллель, который кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, которые удалены, вставлены, дублированы или заменены по отношению к белку дикого типа SEQ ID NO: 6. В одном аспекте мутантный белок представляет собой белок D14 с отсутствующей функцией или белок D14 с пониженной функцией, как указано в других разделах настоящего документа. В одном аспекте мутантный белок представляет собой белок, указанный в Таблице А или Таблице 2.

В одном аспекте мутантный белок содержит дубликацию одной или более аминокислот SEQ ID NO: 94 – 101 SEQ ID NO: 2. В одном аспекте мутантный белок содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте маркер ИДП представляет собой маркер mWM23349015_k2.

Также предусмотрен способ селекции огурца или арбуза, включающий маркерную селекцию (MAS) с использованием маркера ИДП или маркера ОНП для селекции линий огурца или арбуза, причем указанный маркер ИДП или маркер ОНП обнаруживает в образце или образцах геномной ДНК аллель, который кодирует белок дикого типа SEQ ID NO: 8 или 9 и/или аллель, который кодирует мутантный белок, содержащий одну или более аминокислот, которые удалены, вставлены, дублированы или заменены по отношению к белку дикого типа SEQ ID NO: 8 или 9. В одном аспекте мутантный белок содержит дубликацию одной или более аминокислот SEQ ID NO: 94 – 101 SEQ ID NO: 8 или 9.

Указанные выше способы можно использовать для селекции, обнаружения или скрещивания с любыми мутантными аллелями D14, как указано в других разделах настоящего документа.

В другом аспекте предложен способ получения растения, особенно растения арбуза, растения огурца или растения дыни, включающий:

- получение первого инбредного растения, имеющего две копии аллеля D14 дикого типа,

- получение второго инбредного растения, имеющего две копии мутантного аллеля D14, например, мутантного аллеля SEQ ID NO: 5 для арбуза или любого другого мутантного аллеля, описанного по тексту настоящей заявки,

- скрещивание первого растения со вторым растением для получения семян гибрида F1,

- при необходимости, сбор семян гибрида F1.

В другом аспекте предложен способ получения растения, особенно растения арбуза, растения огурца или растения дыни, включающий:

- получение первого инбредного растения, имеющего две копии мутантного аллеля D14,

- получение второго инбредного растения, имеющего две копии мутантного аллеля D14, например, мутантного аллеля SEQ ID NO: 5 для арбуза или любого другого мутантного аллеля, описанного по тексту настоящей заявки,

- скрещивание первого растения со вторым растением для получения семян гибрида F1,

- при необходимости, сбор семян гибрида F1.

В другом аспекте предложен способ получения растения, особенно растения арбуза, растения огурца или растения дыни, включающий:

- получение первого растения, имеющего две копии аллеля D14 дикого типа,

- получение второго растения, имеющего одну или две копии мутантного аллеля D14, например, мутантного аллеля SEQ ID NO: 5 для арбуза или любого другого мутантного аллеля, описанного по тексту настоящей заявки,

- скрещивание первого растения со вторым растением для получения семян растения F1,

- самоопыление растения F1 для получения растения F2 или скрещивание растения F1 с другим растением для получения растения-потомка,

- при необходимости, дальнейшее самоопыление растения F2 или дальнейшее (обратное) скрещивание растения F2 или растения-потомка

предыдущего этапа для получения растения дальнейшим самоопылением или растения обратного скрещивания,

- при необходимости, селекцию растения, имеющего, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля D14.

В дополнительном варианте осуществления способ интрогрессии мутантного аллеля D14 в селекционную линию или сорт арбуза, огурца или дыни, включающий скрещивание растения, содержащего мутантный аллель D14, с растением, лишенным мутантного аллеля D14, обратное скрещивание F1, F2 или других генерирование потомства рекуррентного родителя и, в конечном итоге, селекцию рекуррентного родителя, содержащего мутантный аллель D14.

При необходимости, MAS можно использовать для селекции мутантного аллеля и/или аллеля D14 дикого типа в первом или втором растении или в любом дальнейшем поколении, таком как F2, F3 и т.д., или поколении обратного скрещивания.

Указанные выше способы можно использовать для селекции, обнаружения или скрещивания с любыми мутантными аллелями D14, как указано в других разделах настоящего документа.

Настоящей заявкой предусмотрено семя и/или растение, полученное любым из вышеуказанных способов и содержащее, по меньшей мере, одну, необязательно две копии мутантного аллеля D14.

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- SEQ ID NO: 1: мутантный белок D14 арбуза (CID14ins), содержащий вставку
- SEQ ID NO: 2: белок D14 арбуза дикого типа (CID14)
- SEQ ID NO: 3: кДНК, кодирующая мутантный белок CID14ins SEQ ID NO: 1
- SEQ ID NO: 4: кДНК, кодирующая белок D14 дикого типа SEQ ID NO: 2
- SEQ ID NO: 5: геномная ДНК, кодирующая мутантный белок CID14ins SEQ ID NO: 1, содержащий 24 вставленных/дублированных нуклеотида

- SEQ ID NO: 6: геномная ДНК, кодирующая белок дикого типа CID14, интрон от последовательности нуклеотидов 375 – 463
- SEQ ID NO: 7: белок D14 *Arabidopsis thaliana*
- SEQ ID NO: 8: белок D14 дикого типа огурца, *Cucumis sativus*, CsD14
- SEQ ID NO: 9: белок D14 дикого типа дыни, *Cucumis melo*, CmD14
- SEQ ID NO: 10: праймер FAM KASP-анализа для маркера mWM23349015_k2
- SEQ ID NO: 11: праймер VIC KASP-анализа для маркера mWM23349015_k2
- SEQ ID NO: 12: общий обратный праймер KASP-анализа для маркера mWM23349015_k2
- SEQ ID NO: 13: минус-цепь аллеля дикого типа CID14, используемая для создания праймеров KASP
- SEQ ID NO: 14: минус-цепь мутантного аллеля CID14ins (состоящий из 24 вставленных/дублированных нуклеотидов), используемая для получения праймеров KASP
- SEQ ID NO: 15: геномная ДНК гена огурца дикого типа CsD14
- SEQ ID NO: 16: геномная ДНК гена дикого типа дыни CmD14
- SEQ ID NO: 17: кДНК гена дикого типа огурца CsD14
- SEQ ID NO: 18: кДНК гена дикого типа дыни CmD14

Приведены следующие неограничивающие примеры.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Картирование QTL для вторичного ветвления (также называемого «сильным ветвлением») было выполнено на популяции F2, полученной путем скрещивания сильно ветвящегося сорта Sidekick F1 с запатентованным растением арбуза с нормальным ветвлением.

Фенотипирование проводили путем подсчета количества вторичных ветвей, начинающихся на главном стебле на расстоянии 90 см от кроны до конца стебля. Подсчет проводили по 5-7 растений на линию/генотип и рассчитывали среднее значение вторичного ветвления.

Было обнаружено, что ген на хромосоме 8 обуславливает фенотип с сильным множественным ветвлением у Sidekick F1. Ген содержал дубликацию из 24 нуклеотидов, которые кодировали 8 дополнительных аминокислот по сравнению с геном дикого типа, присутствующим у родителя с нормальным ветвлением. По тексту настоящей заявки ген обозначается CID14. Фенотип с сильным множественным ветвлением наблюдался только тогда, когда мутантный аллель гена (включающий 24-нуклеотидную дубликацию) присутствовал в гомозиготной форме.

Маркер KASP, обозначенный mWM23349015_k2, был разработан для различения аллеля гена дикого типа, представленной в SEQ ID NO: 6, и мутантного аллеля гена, содержащего 24 дополнительных нуклеотида (вставка представляет собой дубликацию 24 нуклеотидов последовательностям дикого типа), как видно в SEQ ID NO: 5. См. Фиг. 4 (последовательность интрона выделена жирным).

Популяции F3 были проанализированы на предмет наличия mWM23349015_k2 и среднего количества вторичных ветвей, а результаты такого анализа приведены ниже:

	генотип mWM23349015_k2	Среднее количество второстепенных ветвей (90 см от кроны)	Относительное увеличение вторичных ветвей по сравнению с диким типом (относительно уровня 100% ветвей)
F3	Гомозиготный по дубликации 24 нуклеотидов (<i>CID14ins/CID14ins</i>)	46,27	240%
F3	Гетерозиготный (<i>CID14ins/CID14</i>)	20,64	
F3	Гомозиготный по аллелю CID14 дикого типа (<i>CID14/CID14</i>)	19,27	100%

Таким образом, мутантный аллель гена (SEQ ID NO: 5; *CID14ins*, содержащий вставку из 24 нуклеотидов) отвечал за изменение среднего характера ветвления растений арбуза, содержащих мутантный аллель в гомозиготной форме, до формирования 45 или более вторичных ветвей.

Анализ KASP mWM23349015_k2 проводился с использованием двух прямых праймеров и общего/обратного праймера:

SEQ ID NO: 10 (праймер Fam, 5'GAGACGGAGTGGCCGACC3') и

SEQ ID NO: 11 (праймер VIC, 5'GGAGACGGAGTGGCCGACA3')

SEQ ID NO: 12 (Общий праймер 5'CACGTCCACCGCTGCGCCTT3').

Праймеры Fam и Vic также содержали хвостовую последовательность на 5'-конце, как указано применительно к KASP-анализу.

Следует отметить, что последовательности ДНК для KASP-анализа были созданы на обратной цепи ДНК (минус-цепи), но могут быть в равной степени созданы на основе плюс-цепи аллеля. Плюс- и минус-цепи являются комплементарными нитями двухцепочечной ДНК. Нуклеотид G представляет собой C в комплементарной цепи, а нуклеотид A представляет собой T в комплементарной цепи.

Последовательности ДНК, использованные для создания праймера для KASP-анализа, mWM23349015_k2 (праймеры FAM и VIC заштрихованы серым):

Аллель дикого типа (минус цепь)	5'GAGTTCGGGACGGCGGATGGAGGCGAGGATGCCGACCATGGCGGAGACGGAGTGGCCGACAAAGGCGCAGCGGTGGACGTGGAGAGAGTCKAGGATGGAGATGAGATCGTCRACGAAGGCG 3' (SEQ ID NO: 13, образец последовательности аллеля дикого типа, не содержащего вставок) (Затененный серый - это праймер VIC)
Аллель вставки (минус цепь)	5'GAGTTCGGGACGGCGGATGGAGGCGAGGATGCCGACCATGGCGGAGACGGAGTGGCCGACAAAGGCGCAGCGGTGGAGTGGCCGACCATGGCGGAGACGGAGTGGCCGACAAAGGCGCAGCGGTGGACGTGGAGAGAGTCKAGGATGGAGATGAGATCGTCRACGAAGGCG 3' (SEQ ID NO: 14, образец последовательности мутантного аллеля, содержащего вставку из 24 нуклеотидов, подчеркнута) (Серым выделен праймер Fam)

Согласно брошюре KASP, в рамках технологии генотипирования KASPTM от LGC, Biosearch TechnologiesTM использована уникальная форма конкурентной аллель-специфической ПЦР (полимеразная цепная реакция), которая обеспечивает высокоточную биаллельную оценку ОНП (однонуклеотидных полиморфизмов) и ВД (вставок/делеций) в определенных локусах в широком диапазоне образцов геномной ДНК. Биаллельная дискриминация достигается за счет конкурентного связывания двух аллель-специфичных прямых праймеров, каждый из которых имеет уникальную хвостовую последовательность, соответствующую одному из двух универсальных зондов; один помечен красителем FAMTM, а другой – HEXTM.

Помимо ДНК-матриц (геномная ДНК различных линий или популяций арбузов, полученных от скрещивания с Sidekick) и ПЦР-праймеров, как описано выше, использовались стандартные компоненты (например, микс для KASP-анализа, мастер-микс для KASP- и т.д.), а также при проведении анализа использовались протоколы анализа, как указано на сайте LGC, Biosearch TechnologiesTM biosearchtech.com/products/pcr-kits-and-reagents/genotyping-assays/kasp-genotyping-chemistry).

График аллельной дискриминации (Фиг. 5) позволяет различать образцы, которые были гомозиготными по дикому типу, гетерозиготными и гомозиготными по аллелю *CID14ins*. Отмечено, что благодаря наличию повторной последовательности/дупликации в аллеле *CID14ins*, аллель *CID14ins*, содержащий образцы (*CID14ins/CID14* или *CID14ins/CID14ins*), генерировал более интенсивный сигнал по сравнению с образцом дикого типа (*CID14/CID14*), при этом распределение сигнала отклоняется от классического распределения на графике аллельной дискриминации, но при этом наблюдается четкое различие генотипов в разных кластерах. Верхний левый кластер на Фигуре 5 предназначен для растений, гомозиготных по аллелю дикого типа, верхний правый кластер предназначен для растений, гомозиготных по мутантному аллелю, включающему вставку/дупликацию, а средний кластер предназначен для гетерозиготных растений.

На Фигуре 4 показано выравнивание двух геномных последовательностей (плюс-цепь), при этом SEQ ID NO:6 представляет собой геномную последовательность дикого типа (без вставки), а SEQ ID NO: 5 представляет собой мутантную последовательность *CID14*, включающую в себя вставку 24

нуклеотидов, которая, в свою очередь, приводит к вставке (дупликации) 8 аминокислот в белок CID14, также именуемых CID14*ins* (см. Фиг. 1 и 3).

Таким образом, описанный выше KASP-анализ может использоваться для обнаружения аллеля дикого типа *CID14* последовательности SEQ ID NO: 6 (без вставки/дупликации 24 нуклеотидов) или мутантного аллеля *CID14* SEQ ID NO: 5, включающей вставку (дупликацию) 24 нуклеотидов в геномную последовательность, т.е. в SEQ ID NO: вставлены 5 нуклеотидов 280 – 303, см. Фиг. 4, что фактически представляет собой дупликацию нуклеотидов 281 – 304 последовательности дикого типа SEQ ID NO: 6 (показаны курсивом на Фиг. 4).

KASP-анализ или другие виды анализа можно использовать для обнаружения аллеля дикого типа гена *CID14* SEQ ID NO: 6 и/или мутантного аллеля гена *CID14*, содержащего один или несколько нуклеотидов, вставленных, удаленных или замененных по отношению к аллелю дикого типа, такого как, например, мутантный аллель SEQ ID NO: 5.

BLAST-анализ белка CID14 относительно базы данных Uniprot/Swiss-prot был выполнен с целью идентификации ортологов гена *CID14* у других видов, и были идентифицированы два ортолога – ген *CsD14 Cucumis sativus*, кодирующий белок SEQ ID NO: 8 и ген *CmD14 Cucumis melo*, кодирующий белок SEQ ID NO: 9.

Пример 2

TILLING-популяция арбуза была подвергнута скринингу, и в гене *CID14* было обнаружено несколько мутантов, приводящих к заменам аминокислот или STOP-кодонам. Мутанты перечислены ниже в таблице 2, а также показаны на Фиг. 6.

Таблица 2

Ген	Мутация в кодоне	Мутация	Подтверждено у растения (He = гетерозиготный, Но = гомозиготный)	Фенотип
dwarf14	GTC (V), ATC (I)	V14I		
dwarf14	CCT (P), TCT (S)	P44S	He	
dwarf14	CTC (L), TTC (F)	L72F		

dwarf14	CAC (H), TAC (Y)	H89Y		
dwarf14	GGC (G), AGC (S)	G121S		
dwarf14	AGC (S), AAC (N)	S139N	He	
dwarf14	TGG (W), TAG (Stop)	W155Stop	He и Ho	He = дикого типа Ho = с множественным ветвлением см. Фиг. 7, правое фото.
dwarf14	GGC (G), GTC (V)	G235V		
dwarf14	CCT (P), CTT (L)	P254L		
dwarf14	CAG (Q), TAG (Stop)	Q255Stop	He	

Мутант W155Stop имеет фенотип с сильным множественным ветвлением, когда мутация представлена в гомозиготной форме (W155*/W155*). Фенотип схож с фенотипом исходного мутанта (*CID14ins/CID14ins*), содержащим дубликацию 8 аминокислот. Среднее количество вторичных ветвей было определено на расстоянии 40 см от кроны и представлено ниже в таблице 3.

Таблица 3

Генотип растений	Среднее количество второстепенных ветвей (40 см от кроны)	Относительное увеличение вторичных ветвей по сравнению с диким типом (относительно уровня 100% ветвей)
W155* гомозиготный аллель	31	238%
W155* гетерозиготный аллель	12	
Дикий тип	13	100%

Поскольку фенотипы идентичны, а белок W155* должен быть нефункциональным (он усечен и лишен 113 аминокислот в С-концевой области), неожиданно можно сделать вывод, что также мутантный аллель *CID14ins* должен кодировать нефункциональный белок, который не передает сигнал о подавлении вторичного ветвления. Таким образом, специалистами сделан вывод о том, что нокаут гена *CID14* или мутанты, которые приводят к возникновению нефункциональных белков *CID14*, больше не передают сигнал и, следовательно, не происходит ингибирование вторичного ветвления. Данное явление также именуется «полным ветвлением» или «сильным ветвлением».

Таким образом возникает понимание того, что могут быть созданы и другие мутанты, в результате чего фенотип с сильным множественным ветвлением будет менее выраженным, при этом некоторое ингибирование вторичного ветвления все еще происходит, соответственно фенотип с сильным множественным ветвлением находится в диапазоне между фенотипом с нормальным ветвлением дикого типа и фенотипом с сильным множественным ветвлением дикого типа, наблюдаемым у растений с *CID14ins/CID14ins* и *W155*/W155**, что приводит к увеличению среднего числа вторичных ветвей относительно растений дикого типа примерно на 240%.

Поскольку белок высококонсервативен, причем почти весь белок представляет собой консервативный домен (IPR00073, см. www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR000073/), могут возникать отдельные аминокислотные замены, делеции и/или вставки, например, в домене IPR00073, что все еще обеспечивает некоторое связывание стриголактона с белковым карманом и некоторую передачу сигнала по сигнальному пути стриголактона. Например, любой из мутантов TILLING в таблице 2 выше может в гомозиготной форме приводить к снижению функции белка *CID14* и к «промежуточному ветвлению», например, по меньшей мере, около 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190% вторичных ветвей относительно растения дикого типа, но не «полному ветвлению», которое наблюдается у растений, где белок *CID14* утратил свою функцию и больше не подавляет вторичное ветвление.

Такая более «умеренное ветвление» или «промежуточное ветвление» желательно, поскольку у сильно ветвящихся растений высокий уровень влажности под листьями, что способствует развитию заболеваний, например, грибковых.

Настоящей заявкой предусмотрены любые вновь индуцированные мутанты гена CID14 (и растения, содержащие их в гетерозиготной или гомозиготной форме), за исключением уже существующего мутанта *CID14ins* (содержащие дупликацию из 8 аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1), особенно мутанты, которые приводят к менее сильному ветвлению («промежуточное ветвление»), чем в случае с мутантом *CID14ins* или мутантом W155*.

Тем не менее, настоящей заявкой также предусмотрен любой нокаутный мутант или мутантный аллель, приводящий к возникновению нефункционального белка CID14, отличному от уже существующего мутанта *CID14ins* (содержащий дупликацию из 8 аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1), равно как и растения, содержащие такие мутанты в гетерозиготной или гомозиготной форме.

Пример 3 – направленный мутагенез.

Таргет-специфичное редактирование генома с использованием сконструированных нуклеаз получило широкое распространение в различных областях. В случае с арбузом Crispr успешно использовался для модификации генов-мишеней, см., например, Wang, Y., Wang, J., Guo, S. et al. CRISPR/Cas9-опосредованный мутагенез ClBG1 уменьшал размер семян и способствовал их прорастанию в арбузе. *Hortic Res* 8, 70 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00506-1>, описанные в которых методы и векторы также можно использовать для генерации мутаций в гене D14.

Одноосновные замены или делеции одного или более нуклеотидов можно осуществлять посредством гомологичной рекомбинации (ГР).

Можно использовать бинарный вектор CRISPR/Cas9, например, как описано в работе Wang *et al.* (*supra*). Конкретные одиночные направляющие РНК (онРНК), направленные на D14, можно выбирать по результатам оценки с использованием CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>). Целевую последовательность клонируют в вектор, который затем используют для трансформации сорта арбуза.

Экспланты арбуза можно трансформировать по модифицированному методу Ю *и др.* (2011 *Plant Cell Rep* 30: 359–371). Вкратце, поверхностно-стерилизованные семена арбуза высевали на базовую твердую среду Мурасиге и Скуга с добавлением 3% сукцинила в течение 3 дней. Затем семядоли без зародыша разрезали на кусочки размером 2×2 мм. Штамм *Agrobacterium tumefaciens* EHA105,

содержащий вектор, может использоваться для трансформации. Экспланты семядолей совместно культивируют в темноте в течение 4 дней, а затем переносят в селективную индукционную среду, содержащую 1,5 мг/л 6 БА, 2 мг/л Баста. Регенерированные адвентивные почки вырезают и переносят в селективную среду элонгации, содержащую 0,1 мг/л 6 БА, 0,01 мг/л НУК, 2 мг/л Баста.

Плазмидный вектор содержит кассеты, экспрессирующие CAS9 и две направляющие РНК (гРНК), а также донорский фрагмент в качестве матрицы для гомологичной репарации (ГР). Экспрессия гена Cas9 и гРНК управляется сильным промотором, таким как промотор убиквитина. гРНК формируются на противоположных нитях двух участков-мишеней.

Донорский фрагмент содержит необходимую мутацию в середине фрагмента, соответствующего последовательности гена-мишени D14 (за исключением мутации). При необходимости, дополнительные синонимичные мутации, которые не меняют аминокислотные остатки в донорном фрагменте, не позволят Cas9 снова разрезать донорский фрагмент после успешной ГР. Фрагмент фланкирован двумя целевыми последовательностями гРНК, включая мотивы, прилегающие к протоспейсеру, соответственно, донорская ДНК может быть высвобождена с помощью Cas9/гРНК из плазмидного вектора; см., например, Sun *et al.* (2016) *Molecular Plant* 9, 628–631 DOI: 10.1016/j.molp.2016.01.001.

Для повышения ГР в эксплантат можно совместно ввести дополнительный свободный донорский фрагмент ДНК. После трансформации регенерированные побеги отбирают, например, на основе устойчивости к антибиотикам, кодируемой плазмидным вектором, выращивают и анализируют на наличие мутаций. Это можно сделать с помощью праймеров для амплификации последовательности гена-мишени из ДНК с помощью ПЦР. Праймеры сконструированы таким образом, что они не в состоянии амплифицировать фрагмент плазмиды. Амплифицированный продукт можно секвенировать для подтверждения наличия мутации.

Растения можно регенерировать из трансформированного растительного материала, содержащего желаемую мутацию, с использованием стандартных методов.

Например, как описано в работе Wang *et al.* (*см. выше*), геномную ДНК можно извлечь из молодых листьев трансгенных растений T0-T4, которая затем

используется для создания матриц для амплификации специфических фрагментов целевого гена с использованием праймеров, фланкирующих два участка-мишени. ПЦР может проводиться при следующих условиях: 94°C/5 мин; 94°C/30 с, 56°C/30 с и 72°C/1 мин (35 циклов); и 72 °C/10 мин в качестве конечного продления. Продукты ПЦР можно напрямую секвенировать, используя стандартные методы.

Трансгенные растения также можно проверить на отсутствие Cas9 с помощью праймеров, специфичных для Cas9. ПЦР может проводиться при следующих условиях: 94°C/5 мин; 94°C/30 с, 60°C/30 с и 72°C/1 мин (29 циклов); и 72 °C/10 мин в качестве конечного продления.

Формула изобретения

1. Растение арбуза, содержащее мутантный аллель гена, именуемого *CID14* (*Citrullus lanatus Dwarf14*), **отличающееся тем**, что мутантный аллель содержит мутацию в одной или более регуляторных последовательностях, приводящую к снижению экспрессии гена или отсутствию экспрессии гена по сравнению с соответствующим аллелем дикого типа, или причем мутантный аллель кодирует белок, содержащий делецию, усечение, вставку или замену одной или более аминокислот по сравнению с белком, кодируемым аллелем дикого типа, что приводит к снижению функции или отсутствию функции белка *CID14*, причем мутантный аллель приводит к тому, что указанное растение формирует повышенное среднее количество вторичных ветвей, когда мутантный аллель находится в гомозиготной форме, и причем мутантный аллель не является мутантным аллелем, который кодирует белок SEQ ID NO: 1,

причем белок *CID 14* аллеля дикого типа кодируется молекулами нуклеиновой кислоты, выбранными из группы, состоящей из:

- a) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют белки с аминокислотной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 2
- b) молекул нуклеиновых кислот, которые содержат нуклеотидную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 6, или ее комплементарную последовательность.

2. Растение арбуза по п. 1, **отличающееся тем**, что мутантный аллель кодирует белок, в котором одна или более аминокислот вставлены, заменены или удалены, что приводит к снижению функции белка, но не к потере функции белка, при этом среднее количество вторичных ветвей выше, чем у гомозиготного растения для аллеля дикого типа *CID14*, но не такое высокое, как у растения, которое является гомозиготным по мутантному аллелю *CID14*, кодирующему нефункциональный белок.

3. Растение арбуза по п. 1 или 2, **отличающееся тем**, что растение гомозиготно по мутантному аллелю и имеет повышенное среднее количество

вторичных ветвей по сравнению с растением, гомозиготным по аллелю дикого типа.

4. Семя, из которого может быть выращено растение по любому из пп. 1 - 3.

5. Способ обнаружения и, при необходимости, селекции растения, семени или части растения арбуза, содержащего, по меньшей мере, одну копию мутантного аллеля гена, именуемого *CID14* (*Citrullus lanatus* Dwarf14), включающий следующие этапы:

- a) предоставление одного или более образцов геномной ДНК одного или более растений, семян или частей растения арбуза,
- b) проведение анализа генотипирования с использованием образцов ДНК с этапа а) в качестве шаблона, позволяющего различать аллель *CID14* дикого типа и мутантный аллель *CID14*, причем указанный анализ генотипирования основан на амплификации нуклеиновой кислоты с использованием *CID14*-аллель-специфичных олигонуклеотидных праймеров, и/или причем указанный анализ генотипирования основан на гибридизации нуклеиновых кислот с использованием *CID14*-аллель-специфичных олигонуклеотидных зондов, и, при необходимости,
- c) селекцию растения, семени или части растения, содержащего одну или две копии мутантного аллеля,

причем мутантный аллель *CID14* содержит один или более нуклеотидов, вставленных, дублированных, удаленных или замененных относительно последовательности SEQ ID NO: 6, что приводит к образованию мутантного белка *CID14*, который содержит одну или более аминокислот, вставленных, дублированных, удаленных или замененных относительно последовательности SEQ ID NO: 2.

6. Способ по п. 5, **отличающийся тем**, что указанные *CID14*-аллель-специфичные олигонуклеотидные праймеры или указанные *CID14*-аллель-специфичные олигонуклеотидные зонды содержат, по меньшей мере, 10 нуклеотидов SEQ ID NO: 6 или комплементарную цепь с SEQ ID NO: 6.

7. Способ по п. 5 или 6, **отличающийся тем**, что мутантный аллель содержит, 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 STOP-кодон.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, **отличающийся тем**, что мутантный аллель содержит последовательность SEQ ID NO: 5.

9. Способ по любому из пп. 5 - 8, **отличающийся тем**, что олигонуклеотидные праймеры или олигонуклеотидные зонды содержат, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, комплементарных SEQ ID NO: 6 или комплементарной последовательности SEQ ID NO: 6.

10. Способ по любому из пп. 5 - 9, **отличающийся тем**, что указанное генотипирование представляет собой KASP-анализ, указанный KASP-анализ включает в себя первый прямой праймер, выявляющий аллель дикого типа SEQ ID NO: 6 в образце ДНК, второй прямой праймер, выявляющий мутантный аллель, содержащий один или более нуклеотидов, вставленных, удаленных или замененных по отношению к SEQ ID NO: 6 в образце ДНК, а также один общий обратный праймер.

Фигура 1

D14 <i>Ins</i>	1	MVNNALLEALNVRVLGTGDRSLVLAHGFGTDQSAWQLIYPSFTPYRVIL	50
ДТ	1	MVNNALLEALNVRVLGTGDRSLVLAHGFGTDQSAWQLIYPSFTPYRVIL	50
D14 <i>Ins</i>	51	YDLVCAGSVNPDFDFDSRYTTLDAFVDDLISILDSLHVHRCAF VGHSVSA	100
ДТ	51	YDLVCAGSVNPDFDFDSRYTTLDAFVDDLISILDSLHVHRCAF-----	93
D14 <i>Ins</i>	101	M VGHSVSAMVGILASIRPELFSKLILIGASPRFLNDGDYHGGFEQSEID	150
ДТ	94	-VGHSVSAMVGILASIRPELFSKLILIGASPRFLNDGDYHGGFEQSEID	142
D14 <i>Ins</i>	151	RVFAAMKANYQSWVNGFAPLAVGADVPAAVQEFSTRLENMRPDISLFSK	200
ДТ	143	RVFAAMKANYQSWVNGFAPLAVGADVPAAVQEFSTRLENMRPDISLFSK	192
D14 <i>Ins</i>	201	VIFSSDLRGLVGLVKVPCCI IQTAQDVSVPASVAIYLRDHLGGRNTVEML	250
ДТ	193	VIFSSDLRGLVGLVKVPCCI IQTAQDVSVPASVAIYLRDHLGGRNTVEML	242
D14 <i>Ins</i>	251	DTEGHLPHLSAPQLLVRKLRRALSR	275
ДТ	243	DTEGHLPHLSAPQLLVRKLRRALSR	267

Фигура 2

```

# Выровненные_последовательности: 2
# 1: ClD14ins
# 2: AtD14
# Матрица: EBLOSUM62
# Штраф_за пробел: 10.0
# Штраф_за продолжение: 0.5
#
# Длина: 275
# Идентичность: 206/275 (74.9%)
# Сходство: 236/275 (85.8%)
# Пробелы: 8/275 ( 2.9%)
# Показатель: 1067.5
#
#
#=====
ClD14ins      1 MVNNALLEALNVRVLGTGDRSLVLAHGFGTDQSAWQLIYPSFTPYRVIL      50
|. . . . :| | | | | | | | :| | | | | .| | | | | | | | | | .| | | .| | | .| | | :|
AtD14        1 MSQHNI LEALNVRVVGTDGDRILFLAHGFGTDQSAWHLILPYFTQNYRVVL      50

ClD14ins     51 YDLVCAGSVNPDFDFDFSRYTTLDAFVDDLISILDSLHVHRCAFVGHSVSA      100
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AtD14        51 YDLVCAGSVNPDYFDNRYTTLDPYVDDLINIVDSLGIQNCAY-----      93

ClD14ins     101 MVGHSVSAMVGI LASIRRPELFSKLILIGASPRFLNDGDYHGGFEQSEID      150
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AtD14        94 -VGHSVSAMIGI IASIRRPELFSKLILIGFSRFLNDEDYHGGFEEGEIE      142

ClD14ins     151 RVFAAMKANYQSWVNGFAPLAVGADVPAAVQEFSRTL FNMRPDISL FVSK      200
:| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :|
AtD14       143 KVFSAMEANYEAWVHGFAPLAVGADVPAAVREFSRTL FNMRPDISL FVSR      192

ClD14ins     201 VIFSSDLRGVLGLVKVPCCI IQTAQDVSVPASVAIYLRDHLGGRNTVEML      250
. : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AtD14       193 TVFNSDLRGVLGLVRVPTCVIQTAKDVSVPASVAEYLRSHLGGDTTVETL      242

ClD14ins     251 DTEGHLPHLSAPQLLVRKLRRLSR      275
. | | | | | . | | | | | . | . . | | | | | |
AtD14       243 KTEGHLPQLSAPAQLAQFLRRALPR      267

```

Фигура 3

```

ClD14ins      MVNNALLEALNVRVLGTGDRSLVLAHGFGTDQSAWQLIYPSFTPYRVI LYDLVCAGSVN
CsD14         MVNNALLEALNVRVLGTGDRFLVLAHGFGTDQSAWQLVYPSFTPYRVI LYDLVCAGSVN
CmD14         MVNNALLEALNVRVLGTGDRFLVLAHGFGTDQSAWQLVYPSFTPYRVI LYDLVCAGSVN
*****:*****

ClD14ins      PDFFDfsRYTTLDAFVDDLISILDSLHVHRCafVGHsVsAMVGHsVsAMVGI LASIRRPE
CsD14         PDFFDfsRYTTLDAFVDDLISILDSLHVHRCaf-----VGHSVsAMVGI LASIRRPE
CmD14         PDFFDfsRYTTLDAFVDDLISILDSLHVHRCaf-----VGHSVsAMVGI LASIRRPE
*****:*****

ClD14ins      LFSKLILIGASPRFLNDGDYHGGFEQSEIDRVFAAMKANYQSWVNGFAPLAVGADVPAAV
CsD14         LFSKLILIGASPRFLNDGDYHGGFEQNEIDRVFAAMKANYQSWVNGFAPLAVGADVPAAV
CmD14         LFSKLILIGASPRFLNDGDYHGGFEQSEIDRVFAAMKANYQSWVNGFAPLAVGADVPAAV
*****:*****

ClD14ins      QEFsRtLFNMRPDISLFVSKVIFSSDLRGVLGLVKVPCCIIQTAQDVSVPTSVAIYLRDH
CsD14         QEFsRtLFNMRPDISLFVSKVIFSSDLRGVLGLVKVPCCIIQTAQDVSVPTSVAIYLRDH
CmD14         QEFsRtLFNMRPDISLFVSKVIFSSDLRGVLGLVKVPCCIIQTAQDVSVPTSVAIYLRDH
*****:*****

ClD14ins      LGGRNTVEMLDTEGHLP HLSAPQLLVRKLRRALS R
CsD14         LGGRNTIEMLDTEGHLP HLSAPQLLVRKLRRALS R
CmD14         LGGRNTIEMLDTEGHLP HLSAPQLLVRKLRRALS R
*****:*****

```

Фигура 4

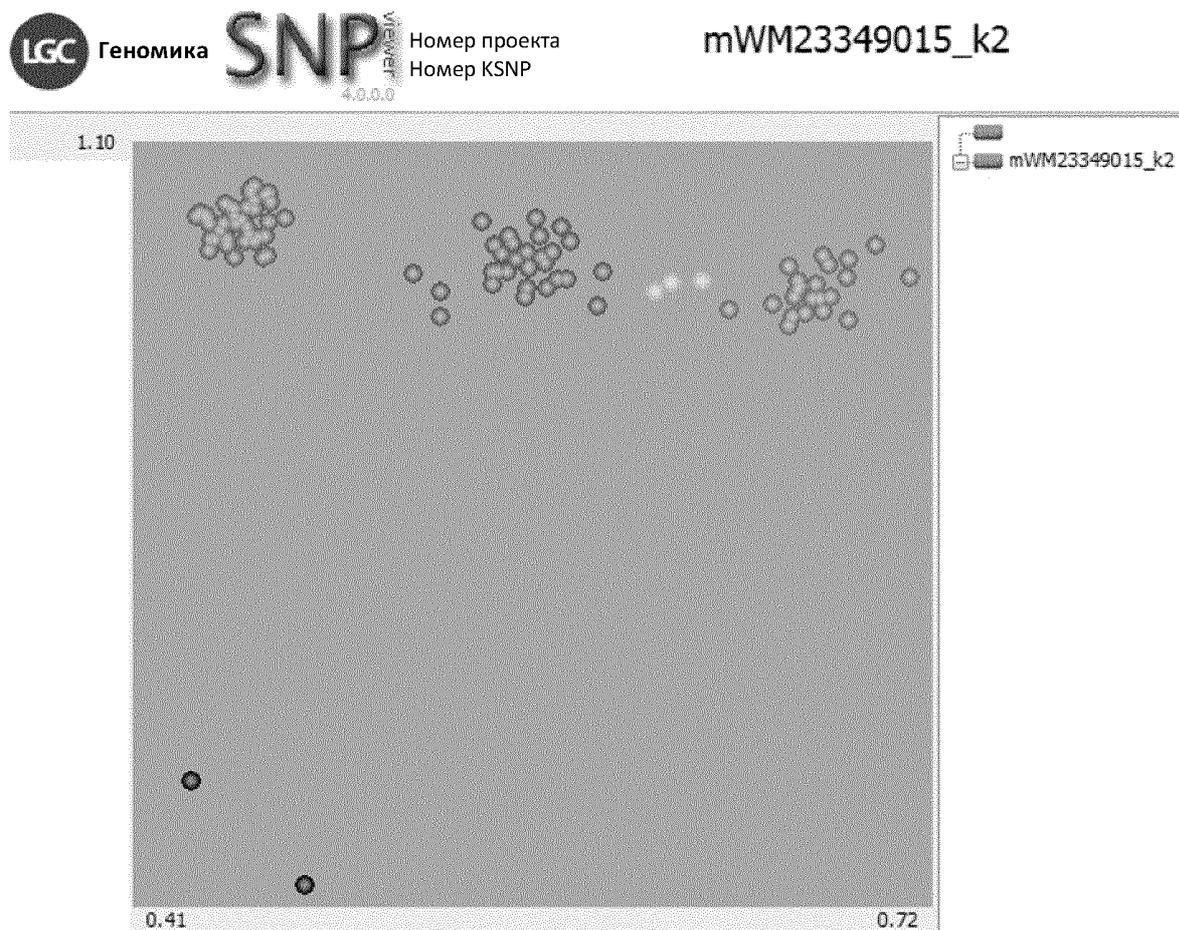
```

# Выровненные_последовательности: 2
# 1: ID6
# 2: ID5
# Матрица: EDNAFULL
# Штраф_за пробел: 10.0
# Штраф_за продолжение: 0.5
#
# Длина: 917
# Идентичность:      893/917 (97.4%)
# Сходство:      893/917 (97.4%)
# Пробелы:      24/917 ( 2.6%)
# Показатель: 4443.5
#
#
#=====
ID6          1 ATGGTTAACAACGCCCTTCTTGAAGCCCTTAATGTCCGTGTCCTCGGCAC      50
  |||
ID5          1 ATGGTTAACAACGCCCTTCTTGAAGCCCTTAATGTCCGTGTCCTCGGCAC      50
  |||
ID6         51 CGGCGACCGTTCTCTGGTCTGGCCCATGGCTTCGGCACCGACCAGTCCG      100
  |||
ID5         51 CGGCGACCGTTCTCTGGTCTGGCCCATGGCTTCGGCACCGACCAGTCCG      100
  |||
ID6        101 CTTGGCAACTCATTACCCTTCTTTACTCCTTACTACCGGTCATCCTT      150
  |||
ID5        101 CTTGGCAACTCATTACCCTTCTTTACTCCTTACTACCGGTCATCCTT      150
  |||
ID6        151 TACGACCTTGTCTGCGCCGGTAGCGTCAACCCGACTTCTTCGATTTCTC      200
  |||
ID5        151 TACGACCTTGTCTGCGCCGGTAGCGTCAACCCGACTTCTTCGATTTCTC      200
  |||
ID6        201 CCGCTACACCACCTCTCGACGCCTTCGTCGACGATCTCATCTCCATCCTAG      250
  |||
ID5        201 CCGCTACACCACCTCTCGACGCCTTCGTCGACGATCTCATCTCCATCCTAG      250
  |||
ID6        251 ACTCTCTCCACGTCCACCGCTGCGCCTTT-----                279
  |||
ID5        251 ACTCTCTCCACGTCCACCGCTGCGCCTTTGTCGGCCACTCCGTCTCCGCC      300
  |||
ID6        280 ---GTCGGCCACTCCGTCTCCGCCATGGTCGGCATCCTCGCCTCCATCCG      326
  |||
ID5        301 ATGGTCGGCCACTCCGTCTCCGCCATGGTCGGCATCCTCGCCTCCATCCG      350
  |||
ID6        327 CCGTCCCGAACTCTTCTAAGCTCATCTTAATCGGCGCCTCCCAAGGT      376
  |||
ID5        351 CCGTCCCGAACTCTTCTAAGCTCATCTTAATCGGCGCCTCCCAAGGT      400
  |||
ID6        377 CTTTTCCACTTCCACACTCTGTTTTTCTAACTACTCTGTTTTTTCCCTT      426
  |||
ID5        401 CTTTTCCACTTCCACACTCTGTTTTTCTAACTACTCTGTTTTTTCCCTT      450
  |||
ID6        427 GTTTTTATAAAATCTTTTTATTTTTATTTTTTTTCAGGTTCCCTCAACGAC      476
  |||
ID5        451 GTTTTTATAAAATCTTTTTATTTTTATTTTTTTTCAGGTTCCCTCAACGAC      500
  |||
ID6        477 GCGACTACCACGGTGGGTTCGAACAGAGCGAGATTGACAGGGTCTTCGC      526
  |||
ID5        501 GCGACTACCACGGTGGGTTCGAACAGAGCGAGATTGACAGGGTCTTCGC      550
  |||

```

ID6	527	TGCAATGAAGGCTAATTACCAATCCTGGGTCAACGGCTTTGCCCTCTTG	576
ID5	551	TGCAATGAAGGCTAATTACCAATCCTGGGTCAACGGCTTTGCCCTCTTG	600
ID6	577	CTGTCGGTGCCGATGTTCCCGCTGCCGTTTCAGGAATTCAGCCGGACTCTC	626
ID5	601	CTGTCGGTGCCGATGTTCCCGCTGCCGTTTCAGGAATTCAGCCGGACTCTC	650
ID6	627	TTCAATATGAGACCCGACATTTCCCTCTTCGTCTCTAAGGTCATCTTCAG	676
ID5	651	TTCAATATGAGACCCGACATTTCCCTCTTCGTCTCTAAGGTCATCTTCAG	700
ID6	677	CAGCGATCTCCGGGGAGTCCTCGGTCTCGTCAAAGTCCCCTGTTGCATAA	726
ID5	701	CAGCGATCTCCGGGGAGTCCTCGGTCTCGTCAAAGTCCCCTGTTGCATAA	750
ID6	727	TTCAAACCGCCCAAGACGTCTCTGTTCCGGCCTCCGTCGCTATCTACCTC	776
ID5	751	TTCAAACCGCCCAAGACGTCTCTGTTCCGGCCTCCGTCGCTATCTACCTC	800
ID6	777	CGAGACCACCTCGGCGGCCGGAACACCGTGGAGATGCTCGACACCGAAGG	826
ID5	801	CGAGACCACCTCGGCGGCCGGAACACCGTGGAGATGCTCGACACCGAAGG	850
ID6	827	CCACCTACCCCATCTGAGTGCCCTCAGCTACTCGTACGGAAACTCCGCC	876
ID5	851	CCACCTACCCCATCTGAGTGCCCTCAGCTACTCGTACGGAAACTCCGCC	900
ID6	877	GTGCTCTTTCCCGGTGA	893
ID5	901	GTGCTCTTTCCCGGTGA	917

Фигура 5



Фигура 7

