



(51) МПК
A01H 3/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A01H 1/02 (2019.05); *A01H 4/008* (2019.05); *A01H 5/08* (2019.05); *C12Q 1/6895* (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2016139421, 10.03.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.03.2015

Дата регистрации:
31.07.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
10.03.2014 US 61/950,315

(43) Дата публикации заявки: 10.04.2018 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 31.07.2019 Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 10.10.2016

(86) Заявка РСТ:
IL 2015/050252 (10.03.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/136532 (17.09.2015)

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.", Лью
Татьяна Нгоковна

(72) Автор(ы):

ТАДМОР Яаков (IL),
 БУРГЕР Йосеф (IL),
 МЕЙР Айяла (IL),
 СААР Узи (IL),
 БАУМКОЛЕР Фабиан (IL),
 ШАФФЕР Артур А. (IL),
 КАЦИР Нурит (IL),
 ОЗ Идо (IL),
 ЛАВИ Тамар (IL)

(73) Патентообладатель(и):

ZE STEIT OF ISRAEL, МИНИСТРИ
 OF АGRICULTURE AND RURAL
 DEVELOPMENT, АGRICULTURAL
 RESEARCH ORGANIZATION (ARO) (IL)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: NAVOT GALPAZ et al., Genetic and
chemical characterization of an EMS induced
mutation in Cucumis melo CRTISO gene,
Archives of Biochemistry and Biophysics, 2013,
Vol. 539, Issue 2, pp. 117-125. KR20040082448 A,
30.09.2004. VALANTIN M. et al., Effect of Fruit
Load on Partitioning of Dry Matter and Energy
in Cantaloupe (Cucumis melo L.), Annals of
(см. прод.)

(54) РАСТЕНИЯ ДЫНИ С ПОВЫШЕННОЙ УРОЖАЙНОСТЬЮ ПЛОДОВ

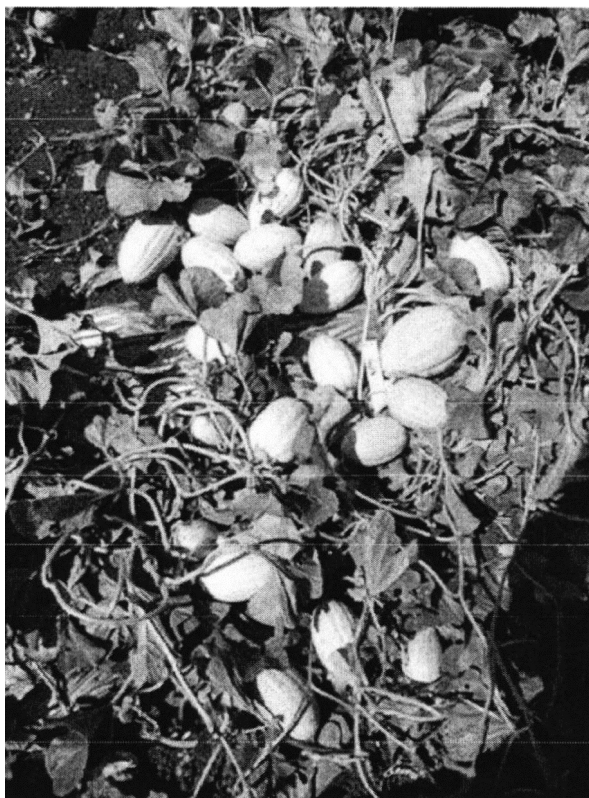
(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии,
в частности к растению Cucumis melo, способному
производить более чем 12 плодов, где указанные
плоды являются бессемянными, к части
вышеуказанного растения, а также к пищевому
продукту, содержащему вышеуказанное растение
или его часть. Также раскрыт способ маркер-

вспомогательной селекции C. melo растения,
способного производить более чем 5 бессемянных
плодов. Изобретение позволяет эффективно
получать растение Cucumis melo, способное
производить более чем 12 плодов. 7 н. и 4 з.п. ф-
лы, 11 ил., 2 табл.

RU 2 696 201 C2

RU 2 696 201 C2



Фиг. 1

(56) (продолжение):

Botany, 1999, Vol.84, Issue 2, pp. 173-181. LEVI A. et al., Genes expressed during the development and ripening of watermelon fruit, Plant Cell Reports, 2006, Vol. 25, Issue 11, pp. 1233-1245. RU 2011111344 A, 10.10.2012.

R U 2 6 9 6 2 0 1 C 2

R U 2 6 9 6 2 0 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A01H 3/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A01H 1/02 (2019.05); A01H 4/008 (2019.05); A01H 5/08 (2019.05); C12Q 1/6895 (2019.05)(21)(22) Application: **2016139421, 10.03.2015**(24) Effective date for property rights:
10.03.2015Registration date:
31.07.2019

Priority:

(30) Convention priority:
10.03.2014 US 61/950,315(43) Application published: **10.04.2018 Bull. № 10**(45) Date of publication: **31.07.2019 Bull. № 22**(85) Commencement of national phase: **10.10.2016**(86) PCT application:
IL 2015/050252 (10.03.2015)(87) PCT publication:
WO 2015/136532 (17.09.2015)

Mail address:

**119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,
"Gouling VLG (Interneshnl) Ink.", Lyu Tatyana
Ngokovna**

(72) Inventor(s):

**TADMOR Yaakov (IL),
BURGER Yosef (IL),
MEIR Ayala (IL),
SAAR Uzi (IL),
BAUMKOLER Fabian (IL),
SCHAFFER Arthur A. (IL),
KATZIR Nurit (IL),
OZ Ido (IL),
LAVEE Tamar (IL)**

(73) Proprietor(s):

**THE STATE OF IZRAEL, MINISTRY OF
AGRICULTURE & RURAL DEVELOPMENT,
AGRICULTURAL RESEARCH
ORGANIZATION (ARO) (IL)****(54) MELON PLANTS WITH INCREASED YIELD OF FRUITS**

(57) Abstract:

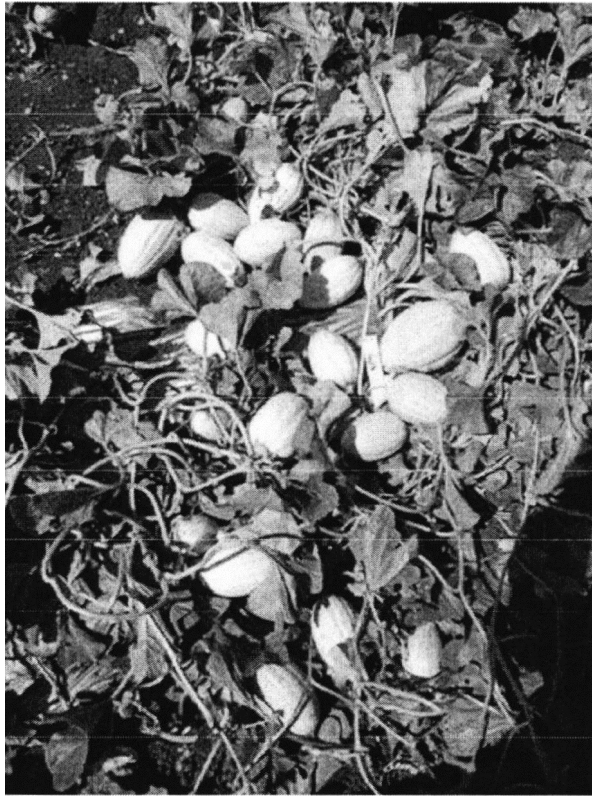
FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry, in particular to a Cucumis melo plant capable of producing more than 12 fruits, wherein said fruits are seedless, to part of said plant, as well as to a food product containing said plant or part thereof. Also disclosed is a method for marker-auxiliary selection of

C. melo plants capable of producing more than 5 seedless fruits.

EFFECT: invention enables efficient production of Cucumis melo plant capable of producing more than 12 fruits.

11 cl, 11 dwg, 2 tbl



Фиг. 1

ОБЛАСТЬ И УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение, в некоторых вариантах его осуществления, относится к растениям дыни, имеющим небольшой бессемянной плод, с повышенной урожайностью плодов и способам их получения.

5 Партенокарпия, получение бессемянных плодов, может быть достигнута путем добавления регуляторов роста растений ауксина, кинина или гиббереллина во многие культуры. Было показано, что экзогенное применение ауксина или гиббереллина к неоплодотворенным цветам в нескольких видах растений, вызывало завязывание плода при отсутствии опыления, в результате чего получали партенокарпный плод. В
10 предыдущих мерах, направленных на получение бессемянных плодов, традиционная селекция растений и экзогенное применение гормонов были использованы с некоторым успехом. Кроме того, экзогенное применение растительных гормонов является трудоемким процессом, а традиционное разведение растений является долгосрочным процессом. При этом по меньшей мере, некоторые из предыдущих попыток получения
15 определенных бессемянных плодов приводили к небольшому количеству бессемянных плодов и/или к относительно небольшим бессемянным плодам по сравнению с нормальными, семенными плодами. В большинстве случаев, это приводило к значительному снижению урожайности в небольших сортах плодов.

Cucumis melo показывает чрезмерное разнообразие для признаков плода. Плоды
20 дыни различаются по размеру, форме, внешнему цвету, запаху и признакам мякоти, таким как содержание сахара, кислотность и пигментация. Однако существует растущий спрос на новые виды плодов на современных продуктовых рынках. В дыне завязывание плодов и количество является особенностью, которая в основном регулируется на гормональном уровне. Завязывание плода подвергается гормональному воздействию
25 в результате удачного или неудачного развития плода на ветке из предшествующего женского цветка, однако общее количество плодов на растение является достаточно постоянным. Как правило, наибольшее количество сортов дыни производит 1-5 плодов на растение в природных условиях.

Существует давно назревшая необходимость в данной области техники в
30 эффективных и экономичных средствах и способах получения бессемянных плодов, особенно с хорошей урожайностью и качеством по сравнению с бессемянными плодами, известными из уровня техники.

Предшествующий уровень техники включает в себя заявку на патент США No. 20120324597 и WO 2011/018785.

35 СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, изобретение предлагает *Cucumis melo* растение или его часть, растение, плодоносящее более чем 12 плодов, где указанный плод бессемянной.

Согласно аспекту некоторых вариантов осуществления, настоящее изобретение
40 предлагает *Cucumis melo* растение, содержащее MELO3C009603/melo3c009603 геном, такое, что при самоопылении 25% F1 плодоносит более чем 12 плодов, где указанные плоды бессемянные.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления, настоящее изобретение предлагает побег *C. melo* растения из растений, описанных в настоящем
45 изобретении.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления, настоящее изобретение предлагает семя *Cucumis melo* растения, содержащего MELO3C009603/melo3c009603 геном, такое, что при самоопылении, 25% F1 плодоносит более чем 12

плодов, где указанные плоды бессемянные.

Согласно аспекту некоторых вариантов осуществления, настоящее изобретение предлагает клетку, содержащую геном любого из растений, описанных в настоящем изобретении.

5 В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления, настоящее изобретение предлагает культуру, включающую в себя множество клеток, описанных в настоящем изобретении.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления, настоящее изобретение предлагает способ селекции первого *C. melo*, включающий в себя
10 скрещивание растений, описанных в настоящем изобретении, со вторым *C. melo* растением, тем самым выращивая *C. melo*.

Согласно аспекту некоторых вариантов осуществления, настоящее изобретение предлагает множество семян *C. melo*, которые гетерозиготны для MELO3C009603 мутации, которая при посадке приводит к фенотипу повышенной урожайностью плодов
15 в 25% от растений, полученных из них.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления, настоящее изобретение предлагает гибридное семя, полученное с помощью способов, описанных в настоящем изобретении.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления, настоящее
20 изобретение предлагает гибридное растение или его часть, полученное выращиванием гибридного семени, описанного в настоящем изобретении.

Согласно аспекту некоторых вариантов осуществления, настоящее изобретение предлагает способ выращивания любого из растений, описанных в настоящем изобретении, включающий в себя вегетативное размножение растения, посредством
25 этого выращивали растение.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, изобретение предлагает выделенный полинуклеотид, включающий в себя последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления, настоящее
30 изобретение предлагает выделенный полипептид, включающий в себя последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

В соответствии с аспектом некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, изобретение предлагает способ маркер-вспомогательной селекции *C. melo* растения, имеющего повышенную урожайность плодов или имеющего потомство с
35 повышенной урожайностью, способ, включающий в себя проведение анализа на наличие мутации потери функции, по меньшей мере, в одной аллели MELO3C009603, отличающийся тем, что наличие указанной мутации показывает, что растение или его потомство будет нести более чем 5 бессемянных плодов.

Согласно аспекту некоторых вариантов осуществления, настоящее изобретение
40 предлагает пищевой продукт или переработанный продукт, включающий в себя растения, описанные в настоящем изобретении, или его части.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения, растение плодоносит более чем 15 плодов.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения, растение плодоносит более
45 чем 20 плодов.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения, растение имеет аналогичное содержание общего количества растворимых твердых веществ (TSS) и содержание β -каротина как *Cucumis melo* растение дикого типа.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, вес общего количества плодов растения больше, чем вес общего количества плодов *Cucumis melo* растения дикого типа.

5 Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, растение представляет собой сорт *C. melo Cantalupensis*.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, обе аллели MELO3C009603 генома растения имеют мутацию потери функции, что приводит к бессемянному признаку.

10 Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, обе аллели указанного MELO3C009603 имеют F/I мутацию в положении 97.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, полинуклеотидная последовательность указанного MELO3C009603 представлена в SEQ ID NO: 7.

15 Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, полипептидная последовательность MELO3C009603 представлена в SEQ ID NO: 8.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, часть растения выбрана из группы, состоящей из корня, стебля, листьев, семядоли, цветов, плода, зародыша и пыльцы.

20 Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, скрещивание включает в себя опыление.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, подвиды указанного растения дыни *melo* выбраны из группы, состоящей из *melo Cantalupensis*, *Noy Yizre'el*, *Ein Dor* и *Piel De Sapo*.

25 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, второе *C. melo* растение не является растением, описанным в настоящем изобретении (напр. не имеет мутации в MELO3C009603).

Согласно некоторым вариантами осуществления настоящего изобретения, 25% растений несут более чем 5 плодов, плоды бессемянные.

30 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, маркер-вспомогательная селекция проводится с применением анализа,

выбранного из группы, состоящей из анализа достройки по одному основанию (SBE), секвенирования аллельспецифического удлинения праймера (ASPE), секвенирования ДНК, секвенирования РНК, анализа на основе микроматрицы, универсальной ПЦР, аллельспецифического удлинения, гибридизации, масс-спектрометрии, сшивание, 35 удлинение-сшивание, и флэп-эндонуклеаза опосредованного анализа.

Если не указано иное, все технические и/или научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, как обычно понимает любой средний специалист в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем 40 изобретении, могут быть использованы в практике или исследовании вариантов осуществления настоящего изобретения, примеры способов и/или материалов описаны в настоящем описании ниже. В случае противоречий, контролироваться будет описанием патента, включающего в себя все определения. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для обязательного 45 ограничения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в настоящем описании, исключительно для примера, со ссылкой на прилагаемые чертежи.

На конкретном примере чертежа в деталях, следует подчеркнуть, что данные показаны в качестве примера и с целью рассмотрения вариантов осуществления настоящего изобретения. В связи с этим, описание вместе с чертежами делает очевидным для специалиста в данной области техники как могут быть реализованы варианты

5 осуществления настоящего изобретения.

На чертежах представлено следующее:

На Фиг. 1 представлена фотография 'супер плодового' ('sf') растения, приносящего плоды в природных условиях.

На ФИГ. 2 представлена фотография внутренней части различных 'sf' типов плода.

10 На ФИГ. 3 представлена фотография всех плодов типичного одного 'sf' растения.

На ФИГ. 4А-С представлены гистограммы, иллюстрирующие характеристики в полевых условиях сегрегантов 'sf' и F₂ дикого типа, полученных от четырех независимых скрещиваний. Горизонтальные сплошные и пунктирные линии обозначают средние значения всех диких типов и 'sf' соответственно. А - средняя величина количества плодов; В - средний вес плодов; С - средний вес плодов на растение (урожайность).

15

На ФИГ. 5А-В представлены гистограммы, иллюстрирующие качество сегрегантов 'sf' и F₂ дикого типа от CEZ x 'sf' скрещиваний. А - средняя величина брикс (TSS) 10 плодов CEZ, 'sf' и сегрегантов дикого типа; В - средняя величина содержания β-каротина 10 плодов CEZ, сегрегантов 'sf' и дикого типа.

20 На ФИГ. 6 представлена фотография продуктов расщепления ApoI 213 пар оснований (bp) ПЦР продукта, амплифицированного из ДНК (слева направо) 'sf', 'CEZ' и их F₁ растений. Размер в парах оснований (bp) ДНК фрагментов отображено слева. Прямой праймер TAGACATGAGCCGCATCTGA (SEQ ID NO: 3) и обратный праймер GAACGTGGCAACAACAACA (SEQ ID NO: 4) применяли для ПЦР амплификации.

25

На ФИГ. 7 представлено выравнивание 'цинкового пальца' (ZF) мотива 'sf' (MELO3C009603), показывающее аминокислотную замену F⁹⁷ к I (красная рамка). Две аминокислоты цистеин и гистидин C₂H₂ выделены жирным шрифтом.

CHYCCRNFPSTQALGGHQNAN (SEQ ID NO: 5); CHYCCRNIPSTQALGGHQNAN (SEQ

30 ID NO: 6).

На ФИГ. 8А-В представлены графики, иллюстрирующие экспрессию MELO3C009603 (sf ген). На Фигуре 8А - РНК секвенирование на основе цифровой экспрессии MELO3C009603 (sf ген) в группах 'sf' и диком типа; На Фигуре 8В - анализ качественной ПЦР с обратной транскриптазой (qRT-PCR) относительной экспрессии (APR1 ген в качестве эталона) MELO3C009603 в тканях, которые включают каждую группу.

35

На ФИГ. 9 представлена диаграмма Венна, показывающая все дифференциально экспрессируемые гены (DEG) в трех сегрегирующих популяциях и перекрытие из них.

На ФИГ. 10А представлен график, иллюстрирующий РНК секвенирование на основе цифровой экспрессии MELO3C021150 (ген нуцеллуса семян) в группах изогенной 'sf' и дикого типа (CEZ);

40

На ФИГ. 10В представлен график, иллюстрирующий относительную экспрессию MELO3C021150 в тканях, которые включают изогенные группы, проанализированные с помощью качественной ПЦР с обратной транскриптазой (qRT-PCR) (APR1 ген в качестве эталона).

45 На ФИГ. 11А-В приведена комплементарная последовательность ДНК дикого типа (ФИГ. 11А - SEQ ID NO: 7) и мутантная аминокислотная последовательность (ФИГ. 11В - SEQ ID NO: 8) MELO3C009603 в мутантных растениях. Фигура 11А. Первый ATG выделен желтым цветом и стоп-кодон TAA выделен красным цветом. 'TTC', который

кодирует 'F' в диком типе, выделен жирным шрифтом, а 'T', которая мутировала в 'A' в 'sf', окрашена в красный цвет; Фигура 11В - последовательность белка 'sf' гена. Домен цинкового пальца окрашен синим цветом, C₂ и H₂ зеленым, а мутантная аминокислота T в красный. QAALGH мотив в ZF домене подчеркнут.

5 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение, в некоторых вариантах его осуществления, относится к растениям дыни, имеющих повышенную урожайность плодов, и способам получения таковых.

10 Прежде, чем объяснять, по меньшей мере, один из вариантов осуществления настоящего изобретения подробно, нужно понимать, что изобретение не обязательно ограничивается в своем применении деталями, изложенными в приведенном ниже описании или примерами которых являются Примеры. Настоящее изобретение допускает другие варианты осуществления изобретения или осуществление на практике или

15 Среди Тыквенных, *C. melo* является одним из наиболее важных культивируемых тыквенных. Их выращивают главным образом для их плодов, которые, как правило, имеют большое разнообразие в размерах (от 500 г до 5 кг), телесном цвете (оранжевый, зеленый и белый), цвете кожуры (зеленый, желтый, белый, оранжевый и серый), форме (круглая, овальная или удлинённая), и размерах (от 5 до 25 см в ширину; от 10 до 50 см

20 в длину). При попытке создания новых сортов растения дыни авторы настоящего изобретения обрабатывали семена CEZ дыни (сорт дыни 'charantais', полученный с помощью ARO химическим мутагеном этил метансульфонатом (EMS) и выбирали 'супер плодовые' растения дыни (называемые в настоящем описании как "sf" растения), которые имели

25 повышенное количество плодов и урожайность (Фигуры 1 и 3). Осмотр плодов от этих растений показал, что их плоды были бессемянными или имели маленькие пустые неразвитые семена (Фигура 2). Анализ каротеноидов в мутантном плоде с помощью ВЭЖХ показал одинаковое содержание бета-каротина по сравнению с немутантными изогенным аналогом, CEZ. Кроме того, содержание общего количества растворимых

30 твердых веществ (TSS) показало, что мутантный плод имеет одинаковое содержание сахара по сравнению с немутантным изогенным аналогом.

'CEZ' растение дикого типа производит в среднем по четыре плода на растение и только один плод будет развиваться на ветке, тогда как 'sf' способен производить много

35 плодов на каждой ветке. В растениях дикого типа, успешное опыление женского цветка и начало развития плода будет подавлять развитие дополнительного плода от следующего женского цветка на той же ветке. Этот механизм подавления инактивируется в 'sf'. Возвратное скрещивание, сделанное с 'sf', показало, что их пыльца полностью плодovита, плоды будут развиваться только после оплодотворения, однако не будут

40 содержать семена или будут маленькие пустые семена в маленьком плоде 'sf'. Таким образом, 'sf' страдает от остановки развития семян, что не мешает развитию плода и не ингибирует производство многих дополнительных плодов на той же ветке.

Было показано, что это уникальное увеличение урожайности регулируется одним рецессивным геном (MELO3C009603, кодирующий цинковый палец типа Cys₂His₂ (C₂H₂)

45 белка), как показывает анализ сегрегации 'sf' в четырех независимых сегрегирующих популяциях F₂.

Таким образом, согласно одному аспекту настоящего изобретения, предложено *C. melo* растение или его часть, где растение плодоносит более чем 12 плодов, где указанный

плод бессемянной.

Термин "растение" в контексте настоящего изобретения, включает в себя цельные растения, предшествующее растение и потомство растений и части растений, включающие в себя семена, плоды, побеги, стебли, корни (в том числе клубни), и растительные клетки, ткани и органы. Растение может быть в любом виде, включая каллус ткань, суспензионную культуру, зародыши, участки меристемы, листья, гаметофиты, спорофиты, пыльцу, семяпочки и микроспоры.

Термин "дыня" в контексте настоящего изобретения, относится к видам *Cucumis melo* L., включая подвиды *agrestis* (vars. *conomon*, *makuwa*, *momordica* и *acidulous*) и *melo* (vars. *cantalupensis*, *reticulatus*, *adana*, *chandalok*, *ameri*, *inodorus*, *flexuosus*, *chate*, *tibish*, *dudaim* и *chito*).

Термин "сорт" используется в настоящем описании для обозначения растения, имеющего биологический статус, отличный от статуса "дикого", где статус "дикий" указывает на первичное некультуренное или естественное состояние растения или прирост. Термин "сорт" (для культивируемых сортов) включает в себя, но не ограничивается ими, полуприродный, полудикий, сорной, традиционные сорта, ландрас, селекционный материал, исследовательский материал, племенную линию, синтетическую популяцию, гибрид, маточный материал/основную популяцию, инбредную линию (родитель гибридного сорта), сегрегирующую популяцию, мутантный/генетический фонд и усовершенственный/улучшенный сорт. Примеры сортов включают в себя такие культурные сорта, которые относятся к таксономическим группам *Cucumis melo* var. *cantalupensis* (плоды канталупы типов *Charantais* и *Italian*), *Cucumis melo* var. *reticularis* (плоды типов *Galia* и *Ananas*), и *Cucumis melo* var. *inodorus* (включающие плоды типов *Piel de Sapo*, *Yellow Canary*, *Branco* и *Honeydew*). Таким образом, растение по настоящему изобретению представляет собой растение любого *C. melo* var. Термин "var." указывает на *varietas* (таксономический уровень ниже, чем у видов, как описано выше).

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения, растение в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения имеет повышенную урожайность плодов по сравнению с растениями дикого типа такого же генетического фона, выращенных в таких же условиях (т.е. плодоносят более чем 10 плодов, 12 плодов, 15 плодов, 20 плодов, 25 плодов или даже более чем 30 плодов в определенный момент времени). Как правило, средний вес каждого плода составляет 350 г с диапазоном 100-600 г, в зависимости от генетического фона (Фигура 4В). Растение может включать, по меньшей мере, 2, по меньшей мере, 3, по меньшей мере, 5 плодов на ветке в определенный момент времени.

Большая часть плодов на растении находятся в одной стадии созревания, в зависимости от степени климатического/не-климатического режима созревания плодов.

Следует иметь в виду, что вес общего количества плодов (т.е. урожайность) указанного растения больше чем вес общего количества плодов растения *Cucumis melo* дикого типа.

В контексте настоящего изобретения фраза "растение *Cucumis melo* дикого типа" относится к растению *Cucumis melo*, имеющее немутированный, встречающийся в природе, геном.

Авторы настоящего изобретения показали, что содержание сахара и содержание бета-каротина растения дыни в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения похоже на их немутированные (дикий тип) аналоги. Следует иметь в виду, что аналоги дикого типа не имеет мутаций в других генах, влияющих на содержание бета-каротина, таких как *CRTISO*, как раскрыто в заявке на патент США No. 20120324597. Таким

образом, растения дыни согласно данному аспекту настоящего изобретения могут быть выращены съедобными и высокого качества при различном генетическом фоне. Они пригодны как свежие продукты или для переработки продуктов такой как, например, консервирования.

5 Как было указано, растения дыни в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения являются бессемянными.

В контексте настоящего изобретения, термин "бессемянная дыня" относится к дыне, которая не содержит оплодотворенные зрелые семена. Хотя дыни по настоящему изобретению не содержат оплодотворенные зрелые семена, дыни могут содержать
10 неоплодотворенные завязи, которые маленькие и белого цвета. Эти неоплодотворенные завязи не считаются истинными семенами. Содержание семян в плодах снижается, по меньшей мере, на 80% по сравнению с дыней дикого типа такого же генетического фона и условий роста.

В соответствии с данным аспектом настоящего изобретения бессемянной признак
15 контролируется с помощью генетической детерминанты и является независимым от экзогенной обработки партенокарпия-индуцирующими растительными гормонами. Таким образом, бессемянной признак получают путем стenosпермокарпии, а не партенокарпии.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения, по
20 меньшей мере, 80% плодов данного растения имеют сниженное содержание семян, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, от 90% до приблизительно 99% или даже 100%.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, 85% плодов данного растения имеют сниженное содержание семян, по
25 меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, от 90% до приблизительно 99% или даже 100%.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения, по меньшей
30 мере, 90% плодов данного растения имеют сниженное содержание семян, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, от 90% до приблизительно 99% или даже 100%.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения, по меньшей
35 мере, 55% плодов данного растения имеют сниженное содержание семян, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, от 90% до приблизительно 99% или даже 100%.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения, по меньшей
40 мере, 99% плодов данного растения имеют сниженное содержание семян, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, от 90% до приблизительно 99% или даже 100%.

Растения дыни в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения
45 характеризуются наличием обоих аллелей гена MELO3C009603 (последовательность кДНК дикого типа - SEQ ID NO: 7), имеющих мутацию потери функции, что приводит к признаку повышенной урожайности плодов (и необязательно бессемянному признаку). MELO3C009603 может иметь одну мутацию, которая приводит к обоим признакам, или две мутации - одна из которых приводит к признаку повешенной урожайности плодов, а другая приводит к бессемянному признаку. В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения, аминокислотная последовательность мутантного MELO3C009603 представлена в SEQ ID NO: 8.

MELO3C009603 может быть в гомозиготной форме или в гетерозиготной форме.

Согласно данному варианту осуществления настоящего изобретения, гомозиготность
45 представляет собой состояние, когда обе аллели в локусе MELO3C009603 характеризуются одинаковой нуклеотидной последовательностью. Гетерозиготность относится к различным состояниям в локусе MELO3C009603 гена.

Термин "аллель", в контексте настоящего изобретения, относится к любому из одного

или нескольких альтернативных форм генного локуса, все из которых аллели относятся к признаку или характеристике. В диплоидной клетке или организме две аллели данного гена занимают соответствующие локусы на паре гомологичных хромосом.

5 Термин "ген" в контексте настоящего изобретения, относится к наследственному фактору, который определяет биологические характеристики организма (т.е. растение дыни), "аллель" представляет собой конкретный ген в паре генов, присутствующий в (диплоидном) растении дыни.

10 Растение называется "гомозиготным" для гена, когда он содержит одинаковые аллели указанного гена, а "гетерозиготным" для гена, когда он содержит два различных аллеля указанного гена. Использование заглавных букв указывает на доминирующий (форму) ген, а использование строчных букв указывает на рецессивный ген: "X,X", следовательно, означает гомозиготу с доминирующим генотипом для гена или свойств X; "X,x" и "x,X" означают генотипы гетерозиготы; и "x,x" означают рецессивные генотипы гомозиготы. Как известно, только рецессивный генотип гомозиготы, как правило, обеспечивает 15 соответствующий рецессивный фенотип (т.е. приводит к растению, которое показывает свойство или признак "x"), тогда как доминантный генотип гетерозиготы и гомозиготы обычно обеспечивает соответствующий доминантный фенотип (т.е. приводит к растению, которое показывает свойство или признак "X"), если другие гены и/или факторы, такие как множественные аллели, супрессоры, кодоминантность и т.д. (тоже) 20 играют роль в определении фенотипа.

"Мутация потери функции" представляет собой мутацию в последовательности гена, которая служит причиной либо снижения или полного отсутствия функции генного продукта, как правило, белка. Мутация потери функции может, к примеру, быть вызвана с помощью усечения генного продукта из-за сдвига рамки считывания или нонсенс- 25 мутации или путем изменения одной или нескольких аминокислот. Фенотип, связанный с аллелем, с мутацией потери функции, является, как правило, рецессивным, но может также быть доминантным.

Согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения, обе аллели MELO3C009603 несут мутации А к Т в положении 3,450,971 на каркасе 11 генома дыни, 30 приводящие к F/I аминокислотной замене в положении 97 ожидаемого MELO3C009603 белка. Примерная полинуклеотидная последовательность мутантного MELO3C009603 представлена в SEQ ID NO: 9. Примерная полипептидная последовательность мутантного MELO3C009603 представлена в SEQ ID NO: 8.

Следует понимать, что настоящее изобретение также предусматривает получение 35 плода *Cucumis melo*, делая обрезку из 'sf', растений дыни и выполняя вегетативное размножение.

Вегетативное размножение может быть осуществлено с использованием способов, известных из хорошо известной области техники, например, культивирование растительной ткани *in-vitro*, укоренение бокового побега или слияние протопластов. В 40 одном варианте осуществления настоящего изобретения, способ вегетативного размножения растения по настоящему изобретению включает в себя: а) сбор ткани растения по настоящему изобретению; б) культивирование указанной ткани для достижения пролиферации побега; с) укоренение указанного пролиферирующего побега для получения укоренившихся проростков; и d) выращивание растений от указанных 45 укоренившихся проростков.

Побеги согласно данному аспекту настоящего изобретения могут включать корни, стебли, листья, семядоли, цветы, плоды, зародыши и пыльцу. Предпочтительно, побеги включают в себя стебли и эпическую или боковую меристему побега.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, растения по настоящему изобретению представляют собой гибридный сорт - т.е. получают после скрещивания (т.е. спаривания) двух не-изогенных растений. Гибрид может быть гибрид F₁ или перекрестноопыляющийся вид.

5 "Гибрид F₁" в контексте настоящего изобретения, относится к поколению первого поколения скрещивания двух не-изогенных растений.

Развитие гибридов дыни по настоящему изобретению требует разработки стабильных родительских клеточных линий, при этом, по меньшей мере, одна из них является гетерозиготной по *sf* гену. В программах селекции желательные признаки от двух или 10 более источников зародышевой плазмы или генных пулов объединяют для развития превосходных сортов селекции. Желательные инбредные или родительские линии получают с помощью непрерывного самоопыления и отбором лучших селекционных линий, иногда с использованием молекулярных маркеров для ускорения процесса отбора.

15 После того, как родительские линии, которые давали наилучшую гибридную продуктивность, были идентифицированы, напр., как несущие мутацию в MELO3C009603, гибридное семя могло быть получены до бесконечности, поскольку гомогенность родителей сохраняется. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, растения дыни по настоящему изобретению являются стабильными 20 родительскими клеточными линиями растения (несущие мутацию потери функции в MELO3C009603 гене в гетерозиготной форме).

В контексте настоящего изобретения, фраза "стабильные родительские клеточные линии" относятся к перекрестноопыляющимся, инбредным линиям, стабильные для 25 желаемых растений в течение циклов самоопыления и посадки. Как правило, 95% генома в родительских клеточных линиях по настоящему изобретению находится в гомозиготной форме.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение предлагает способ получения первого поколения (F₁) 'sf' гибридных проростков дыни.

30 Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение предлагает способ получения первого поколения 'sf' гибридных проростков (а также семян), включающий в себя скрещивание (напр. опыление) первого стабильного родительского растения дыни, которое является бессемянным и имеет повышенную урожайность плодов (напр. либо гомозигота или гетерозигота по мутации 35 MELO3C009603) со вторым стабильным 'sf' гетерозиготным родительским растением дыни.

Следует понимать, что 25 или 50% гибридных семян F₁ дыни были гомозиготными по мутации MELO3C009603 в зависимости от того, одна или обе родительских линии являются гетерозиготами 'sf'.

40 Согласно другому варианту осуществления, настоящее изобретение также предлагает маркерную ДНК, которая позволяет отобрать F₁ 'sf' проростки.

Таким образом, согласно другому аспекту настоящего изобретения, предложено *Cucumis melo* растение, имеющее MELO3C009603/melo3c009603 геном, такое, что при самоопылении 25% F₁ несет более чем 5 плодов, где указанные плоды бессемянные.

45 Настоящее изобретение также относится к семенам, собранным от этих F₁ гибридных растений дыни и растений, выращенных от этих семян.

Общепринятой практикой в селекции растений используется способ обратного скрещивания для выведения новых сортов путем преобразования одного признака.

Фраза "единичное преобразование признака" в контексте настоящего изобретения относится к включению нового единичного гена в родительскую линию, где по существу все желаемые морфологические и физиологические характеристики родительских линий восстанавливаются в дополнение к перенесенному единичному гену.

5 Термин "возвратное скрещивание" в контексте настоящего изобретения относится к повторному скрещиванию гибридного потомства обратно одним из родительских растение дыни. Родительское растение дыни, которое дает ген желаемой характеристики, называется небэкррессируемым или родителем-донором. Эта терминология относится к тому факту, что небэкррессируемый родитель применяется один раз при возвратном
10 скрещивании и, следовательно, не повторяется. Родительское растение дыни, к которому ген от небэкррессируемого родителя переносится, известен как рекуррентный родитель, поскольку он применяется для нескольких циклов в протоколе возвратного скрещивания.

В обычном протоколе возвратного скрещивания, растение от оригинальных сортов, представляющих интерес (рекуррентный родитель) скрещивают с растением, выбранным
15 из вторых сортов (небэкррессируемый родитель), которое несет интересующий единичный ген, подлежащий переносу. Полученное в результате этого скрещивания потомство затем скрещивают снова с рекуррентным родителем и процесс повторяют до тех пор, пока не будет получено растение дыни, в котором по существу все желаемые морфологические и физиологические характеристики рекуррентного родителя
20 восстановятся в преобразованном растении, в дополнение к единичному перенесенному гену от небэкррессируемого родителя.

Таким образом, почти изогенные линии (NIL) могут быть созданы путем многократных возвратных скрещиваний для получения матрицы отдельных растений, которые являются почти идентичными по набору генов, за исключением признака или
25 геномной области под вопросом в случае 'sf' мутации в MELO3C009603.

Способы возвратного скрещивания могут применяться с настоящим изобретением для улучшения или введения характеристики в родительские линии.

Может быть выполнена маркер-вспомогательная селекция *S. melo* растений, которые плодоносят более чем 5 бессемянных плодов (или их частей, которые способны
30 производить растение, которое несет более чем 5 бессемянных плодов). Это особенно удобно для селекции побегов или в течение процесса возвратного скрещивания. Способ включает в себя анализ на наличие A/T мутации, которая приводит к аминокислотной замене F/I в положении 97 MELO3C009603 ожидаемого белка, в котором присутствие мутации указывает, что растение несет более чем 5 бессемянных плодов или его часть
35 будет производить более чем 5 бессемянных плодов.

Многие способы известны из данной области техники для анализа на наличие мутаций, в том числе, например, анализ достройки по одному основанию (SBE), секвенирование аллель-специфического удлинения праймера (ASPE), ДНК секвенирование, РНК секвенирование, анализ на основе микроматрицы, универсальная
40 ПЦР, аллель-специфическое удлинение, гибридизация, масс-спектрометрия, сшивание, удлинение-сшивание, флэп-эндонуклеаза опосредованный анализ, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), электрофорез, линейная последовательность, аллель-специфическая олионуклеотидная гибридизация (ASO) и случайно амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD).

45 Таким образом, настоящее изобретение предполагает олигонуклеотиды (напр. праймеры), которые могут применяться для проведения различий между мутантной и немутантной формой MELO3C009603. Примерный набор праймеров описан в разделе Примеров - SEQ ID NOs: 3 и 4.

Настоящее изобретение предполагает как химический мутагенез, так и рекомбинантные способы для получения растения дыни по настоящему изобретению.

Таким образом, растения дыни по настоящему изобретению могут быть получены путем воздействия на растение дыни или ее часть химическим мутагеном. Примеры химических мутагенов включают, но не ограничиваются ими, азотистую кислоту, алкилирующее вещество, такое как этил метансульфонат (EMS), метил метан сульфонат (MMS), диэтилсульфат (DES), и аналоги основания, такие как 5-бром-дезоксигуанидин (5BU). Примерный способ получения растения дыни по настоящему изобретению с применением химических мутагенов включает в себя замачивание семян дыни в течение 12 часов в воде с последующими дополнительными 12 часами в EMS (напр. 1%). Обработанные семена (M_1) затем высаживают и самоопыляются для создания семейства M_2 .

Как упоминалось, растение дыни по настоящему изобретению может также быть получено с применением других способов, включая в себя, но не ограничиваясь ими, (a) делеции MELO3C009603 гена; (b) транскрипционной инактивации MELO3C009603 гена (c) антисмысловая РНК опосредованная инактивация транскриптов MELO3C009603 гена; (d) трансляционная инактивация транскриптов MELO3C009603 гена; и (e) геномное редактирование MELO3C009603 гена.

Таким образом, например, конструкторы ген нокин или ген нокаут, включая последовательности, гомологичные с MELO3C009603 геном, могут быть получены и применяться для вставки вспомогательной последовательности в кодирующую последовательность гена, кодирующего фермент, чтобы, таким образом, инактивировать данный ген.

Эти конструкции предпочтительно включают в себя маркеры позитивного и негативного отбора и поэтому могут применяться в отборе для явления гомологичной рекомбинации. Специалист в данной области техники может легко создать конструкцию нокин/нокаут, включая положительные и отрицательные гены селекции для эффективного отбора трансформированных растительных клеток, которые подверглись явлению гомологичной рекомбинации с конструкцией. Такие клетки могут затем вырасти в полноценные растения. Стандартные способы, известные из уровня техники, могут применяться для проведения нокин/нокаут процедуры. Такие способы изложены, например, в патентах США Nos. 5,487,992, 5,464,764, 5,387,742, 5,360,735, 5,347,075, 5,298,422, 5,288,846, 5,221,778, 5,175,385, 5,175,384, 5,175,383, 4,736,866 а также Burke и Olson, *Methods in Enzymology*, 194: 251-270, 1991; Capecchi, *Science* 244: 1288-1292, 1989; Davies et al., *Nucleic Acids Research*, 20 (11) 2693-2698, 1992; Dickinson et al., *Human Molecular Genetics*, 2 (8): 1299-1302, 1993; Duff и Lincoln, "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells", *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*, 1995; Huxley et al., *Genomics*, 9: 742-750 1991; Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-261 1993; Lamb et al., *Nature Genetics*, 5: 22-29, 1993; Pearson и Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90: 10578-82; Rothstein, *Methods in Enzymology*, 194: 281-301, 1991; Schedl et al., *Nature*, 362: 258-261, 1993; Strauss et al., *Science*, 259: 1904-1907, 1993, WO 94/23049, WO 93/14200, WO 94/06908 и WO 94/28123 также предоставляют информацию.

Таким образом, согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения, растение дыни получено путем введения в него конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую полинуклеотидное вещество, которое активирует экспрессию MELO3C009603, имеющего мутацию, которая приводит к признаку повышенной урожайности (и необязательно

бессемянному признаку) и действующий в цис-положении регулирующий элемент, способный направлять экспрессию полинуклеотидного вещества в растении.

Конструкции, применяемые в способах согласно настоящему изобретению, могут быть созданы с использованием технологии рекомбинантной ДНК, хорошо известной 5 специалистам в данной области техники. Генетические конструкции могут быть введены в векторы, которые могут быть коммерчески доступны, пригодными для трансформирования в растения и подходящие для экспрессии интересующего гена в трансформированных клетках. Генетическая конструкция может быть экспрессионным 10 вектором, в котором нуклеотидная последовательность функционально связана с одной или несколькими регуляторными последовательностями, обеспечивающего экспрессию в растительных клетках.

Полинуклеотид согласно данному аспекту настоящего изобретения может кодировать MELO3C009603, имеющего, например, F/I мутацию в положении 97. Полипептидная 15 последовательность примерного MELO3C009603, имеющего F/I мутацию в положении 97, является, как правило, по меньшей мере, на 90% гомологичной, по меньшей мере, 91% гомологичной, по меньшей мере, 92% гомологичной, по меньшей мере, 93% гомологичной, по меньшей мере, 94% гомологичной, по меньшей мере, 95% гомологичной, по меньшей мере, 96% гомологичной, по меньшей мере, 97% гомологичной, по меньшей мере, 98% гомологичной, по меньшей мере, 99% 20 гомологичной, или 100% гомологичной к последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8. Нуклеотидная последовательность примерного полинуклеотида, который кодирует такой белок, может быть, по меньшей мере, на 90% гомологичной, по меньшей мере, 91% гомологичной, по меньшей мере, 92% гомологичной, по меньшей мере, 93% гомологичной, по меньшей мере, 94% гомологичной, по меньшей мере, 95% 25 гомологичной, по меньшей мере, 96% гомологичной, по меньшей мере, 97% гомологичной, по меньшей мере, 98% гомологичной, по меньшей мере, 99% гомологичной, или 100% гомологичной к нуклеиновой последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения регуляторная 30 последовательность представляет собой промотор, экспрессируемый в растениях.

В контексте настоящего изобретения фраза "экспрессируемый в растениях" относится к промоторной последовательности, в том числе любого дополнительного регуляторного элемента, добавленного к нему или содержащегося в нем, по меньшей мере, способной индуцировать, обеспечивать, активировать или усиливать экспрессию 35 в клетке, ткани или органе дыни.

Промотор может быть индуцибельный промотор, конститутивный промотор или ткань-ассоциированный промотор.

В контексте настоящего изобретения, термин "индуцибельный промотор" относится к любому промотору, активность которого зависит от конкретной окружающей среды 40 или условий развития.

В контексте настоящего изобретения, термин "конститутивный промотор" относится к любому промотору, который управляет производством РНК во многих или всех тканях трансформированных растения в большинстве случаев.

В контексте настоящего изобретения, термин "ткань-ассоциированный промотор" 45 относится к любому промотору, который управляет процессом синтеза РНК на высоких уровнях в конкретных типах клеток и тканей (напр., плод-ассоциированный промотор).

Примеры промоторов, которые могут применяться для экспрессии функционально связанной нуклеотидной последовательности (т.е. трансгена), включая промотор вируса

мозаики цветной капусты, CaMV и промотор вируса табачной мозаики, TMV.

Другие промоторы, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, включают те, которые описаны в патенте США No. 20060168699 и by Hector G. Numez-Palenius et al. [Critical Reviews in Biotechnology, Volume 28, Issue 1 March 5 2008, pages 13-55], оба из которых включены в настоящее описание посредством ссылки.

Растительные клетки могут быть трансформированы устойчиво или временно с конструкциями нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. В устойчивой трансформации молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению интегрирована в растительный геном и, в связи с этим, она представляет собой 10 устойчивый и наследуемый признак. Во временной трансформации молекула нуклеиновой кислоты экспрессируется трансформированной клеткой, но она не интегрирована в геном и, в связи с этим, она представляет собой временный признак.

Существуют различные способы введения чужеродных генов в оба однодольные и двудольные растения (Potrykus, I., Annu. Rev. Plant. Physiol., Plant. Mol. Biol. (1991) 42: 15 205-225; Shimamoto et al., Nature (1989) 338: 274-276).

Основные способы, вызывающие устойчивую интеграцию экзогенной ДНК в растительную геномную ДНК, включают в себя два основных подхода:

(i) Agrobacterium-опосредованный перенос генов: Klee et al. (1987) Annu. Rev. Plant Physiol. 38: 467-486; Klee and Rogers in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 20 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J., и Vasil, L.K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 2-25; Gatenby, in Plant Biotechnology, eds. Kung, S. и Arntzen, C.J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) p. 93-112.

(ii) прямое поглощение ДНК: Paszkowski et al., в Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes eds. Schell, J., и Vasil, L.K., Academic 25 Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 52-68; включающее в себя способы для прямого поглощения ДНК в протопласты, Toriyama, K. et al. (1988) Bio/Technology 6: 1072-1074. Поглощение ДНК индуцировали при помощи короткого электрического шока растительных клеток: Zhang et al. Plant Cell Rep. (1988) 7: 379-384. Fromm et al. Nature (1986) 319: 791-793. Введение ДНК в растительные клетки или ткани DN при помощи 30 бомбардировки микрочастицами, Klein et al. Bio/Technology (1988) 6: 559-563; McCabe et al. Bio/Technology (1988) 6: 923-926; Sanford, Physiol. Plant. (1990) 79: 206-209; путем применения систем микропипетирования: Neuhaus et al., Theor. Appl. Genet. (1987) 75: 30-36; Neuhaus and Spangenberg, Physiol. Plant. (1990) 79: 213-217; трансформация культур клеток, эмбрионов или костной ткани с применением нитей стекловолокна или карбида 35 кремния, патент США No. 5,464,765 или с помощью прямой инкубации ДНК с зародышевой пылью, DeWet et al. in Experimental Manipulation of Ovule Tissue, eds. Chapman, G. P. and Mantell, S. H. and Daniels, W. Longman, London, (1985) p. 197-209; and Ohta, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83: 715-719.

Система Agrobacterium включает в себя применение плазмидных векторов, которые 40 содержат определенные сегменты ДНК, интегрирующие в геномную ДНК растения. Способы инокуляции растительной ткани очень зависят от растительных видов и системы доставки Agrobacterium. Широко используемой методикой является способ листовой пластины, который может осуществляться с любым эксплантатом ткани, что обеспечивает хороший источник для инициации дифференциации всего растения. Horsch 45 et al. in Plant Molecular Biology Manual A5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) p. 1-9. Дополнительный подход использует систему доставки Agrobacterium совместно с вакуумной инфльтрацией. Система Agrobacterium является особенно жизнеспособной в создании трансгенных двудольных растений.

Существуют различные способы прямого переноса ДНК в клетки растения. При электропорации протопласты подвергаются кратковременному воздействию сильного электрического поля. При микроинъекции, ДНК механически вводят напрямую в клетки, применяя очень маленькие микропипетки. При бомбардировки микрочастицами, ДНК адсорбируют на бомбардирующие микрочастицы, такие как кристаллы сульфата магния или вольфрамовые частицы, а бомбардирующие микрочастицы физически ускоряют в клетки и ткани растения.

После устойчивой трансформации проводят выращивание растения. Наиболее распространенный способ выращивания растения является посев семян. Однако, регенерация путем выращивания семян имеет недостаток, что в связи с гетерозиготностью наблюдается отсутствия единообразия в культуре, поскольку семена образуются растениями в соответствии с генетической изменчивостью, обусловленной законами Менделя. В основном, каждое семя генетически отличается, и каждое из них будет расти со своими собственными специфическими признаками. Таким образом, предпочтительно, чтобы трансформированное растение было получено таким, что восстановленное растение имело идентичные признаки и свойства родительского трансгенного растения. Таким образом, предпочтительно, что трансформированное растение будет восстановлено с помощью вегетативного размножения, которое обеспечивает быстрое, устойчивое размножение трансформированных растений.

Вегетативное размножение представляет собой процесс роста нового поколения растений из одного образца ткани, который был отделен от выбранного родительского растения или сорта. Этот процесс позволяет массовое размножение растений, имеющих предпочтительную тканевую экспрессию гибридного белка. Новое поколение растений, которые производят, являются генетически идентичными и имеют все свойства первичного растения. Вегетативное размножение позволяет массовое размножение качественного растительного материала за короткий период времени и предлагает быстрое размножение выбранных сортов с сохранением свойств первичного трансгенного или трансформированного растения. Преимуществом вегетативного размножения растений является скорость размножения растения и качество и единообразие производимых растений.

Вегетативное размножение представляет собой многоступенчатый способ, который требует изменений среды культивирования или условий роста между стадиями. Таким образом, процесс вегетативного размножения включает в себя четыре основных стадии: Стадия первая, начальное культивирование ткани; Стадия вторая, размножение тканевой культуры; Стадия третья, дифференциация и формирование растения; и Стадия четвертая, культивирование в теплице и укрепление. В течение первой стадии, начального культивирования ткани, создавали культуру ткани и подтверждали отсутствия контаминации. В течение второй стадии, начальную тканевую культуру размножали до тех пор, пока не получали достаточного количества образцов ткани для удовлетворения производственных задач. В течение третьей стадии, образцы ткани, выращенные во второй стадии, разделяли и выращивали в отдельные проростки. На четвертой стадии, трансформированные проростки переносили в теплицу для укрепления, где устойчивость растений к свету постепенно увеличивалась так, что их становилось возможно выращивать в естественной среде.

Несмотря на то, что устойчивая трансформация является в настоящее время предпочтительной, неустойчивая трансформация клеток листьев, меристемных клеток или целого растения также предусмотрена настоящим изобретением.

Неустойчивая трансформация может быть выполнена с помощью любого способа

прямого переноса ДНК, описанных выше, или с помощью вирусного заражения с использованием модифицированных вирусов растений.

Вирусы, для которых показано, что они пригодны для трансформации растений-хозяев, включают в себя CaMV, TMV и BV. Трансформация растения с применением 5 вирусов растений, описана в патенте США No. 4,855,237 (BGV), EP-A 67,553 (TMV), Japanese Published Application No. 63-14693 (TMV), EPA 194,809 (BV), EPA 278,667 (BV); и Gluzman, Y. et al., Communications in Molecular Biology: Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 172-189 (1988). Псевдовиральные частицы для применения в экспрессии чужеродной ДНК во многих хозяевах, в том числе растениях, описаны в 10 WO 87/06261.

В контексте настоящего изобретения, термин "приблизительно" относится к $\pm 10\%$.

Термины "содержит", "содержащий", "включает", "включающий", "имеющий" и их производные означают "включая, но не ограничивается ими".

Термин "состоящий из" означает "включая и ограничиваясь ими".

15 Термин "состоящей в основном из" означает, что композиция, способ или структура может включать в себя дополнительные составные части, стадии и/или части, но только если дополнительные составные части, стадии и/или части не существенно изменяют основные и новые свойства заявленной композиции, способы или структуры.

В контексте настоящего изобретения, форма единственного числа включает формы 20 множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Например, термин "соединение" или "по меньшей мере одно соединение" может включать в себя множество соединений, включая их смеси.

В контексте настоящего изобретения термин "способ" относится к методам, средствам, 25 техническим приемам и порядку действий для достижения данной задачи, включая, но не ограничиваясь ими, такие методы, средства технические приемы и порядок действий либо известные, или легко разрабатываемые из известных методов, средств, технических приемов и порядка действий специалистами в области химии, фармакологии, биологии, биохимии и медицины.

Следует принимать во внимание, что определенные признаки по настоящему 30 изобретению, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления настоящего изобретения, могут также применяться совместно с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения. Наоборот, различные признаки по настоящему изобретению, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления настоящего изобретения, могут также применяться отдельно 35 или в любой подходящей субкомбинации или в качестве подходящих в любом другом описанном варианте осуществления изобретения. Некоторые признаки, описанные в контексте различных вариантов осуществления настоящего изобретения, не должны рассматриваться как существенные признаки таких вариантов осуществления настоящего изобретения, если осуществление изобретения не эффективно без этих 40 элементов.

Различные варианты осуществления и аспекты настоящего изобретения, как это описано выше, и как заявлено в разделе формулы настоящего изобретения ниже, нашли экспериментальное подтверждение в следующих примерах.

ПРИМЕРЫ

45 Обратимся к следующим примерам, которые вместе с приведенным выше описанием иллюстрируют некоторые варианты осуществления настоящего изобретения в неограничивающей форме.

Как правило, номенклатура в контексте данного изобретения и лабораторные

методики, применяемые в настоящем изобретении, включают в себя молекулярные, биохимические, микробиологические методики и технологию рекомбинантной ДНК. Такие методики подробно описаны в литературе. Смотри, например, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); методологии предложены в патентах США Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 и 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J.E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., New York (1980); доступные иммунологические анализы широко описаны в патентной и научной литературе, смотри, например, патенты США Nos. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 и 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); все из которых включены посредством ссылок в полном объеме в настоящее изобретение. Другие общие ссылки приводятся в настоящем изобретении. Процедуры в них, как полагают, хорошо известны из данного уровня техники и представлены для удобства читателя. Вся информация, содержащаяся в них, включена в настоящее изобретение посредством ссылки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

Семена 'CEZ', 'Charentais' типа дыни (*Cucumis melo* подвид *melo Cantalupensis* Group), подвергались EMS мутагенезу, M₁ растения были самоопыляемыми, M₂ семейства визуально фенотипичными, а мутантные линии были отобраны, как описано ранее (Tadmor et al., 2007). Растения выращивали в обычных условиях на природе и в теплице.

Анализ каротиноидов плодов

Были собраны пять зрелых плодов, очищали, нарезали и центральную часть разрезали на маленькие кубики и немедленно замораживали в жидком азоте. Замороженные образцы плодов измельчали до мелкого порошка с помощью A11 аналитической мельницы (Ika) в присутствии жидкого азота. Каротиноиды извлекали из 0.5 г основной паренхимы в смеси гексан : ацетон : этанол (50:25:25, об/об/об), как описано в Tadmor et al., (2005) и анализировали, идентифицировали и оценивали количественно с помощью ВЭЖХ аппарата Waters 2695 (Milford, MA), оборудованного детектором Waters 996 PDA и программным обеспечением Millennium (Waters), как описано ранее (Tadmor et al., 2000).

Выделение РНК

Выделение РНК для анализа секвенирования РНК проводили согласно с Portnoy et

al 2011, как описано ниже. Дополнительное выделение РНК для полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-PCR) применяли тот же протокол, уменьшенный до 1/20, начиная с приблизительно 100 мг замороженной ткани в 1.5 мл пробирки.

Замороженную ткань кожуры плода (приблизительно 5 г 1.5 мм шириной кожуры
5 плода) измельчали со ступкой и пестиком в жидком азоте. Измельченную ткань хорошо перемешивали с помощью вортекса в 50 мл пробирке с 10 мл буфера для экстракции, содержащем 0.2 М Tris-HCl (pH 9.0), 0.2 М этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), 0.4 М NaCl и 2% (масса/объем) SDS, и инкубировали при 65°C в течение 5 минут. Затем
10 30% (масса/объем) лоуроилсаркозин натрия добавляли до конечной концентрации 2% (об/об), и смесь перемешивали на вортексе и инкубировали при 65°C в течение от 2 до 3 минут. К раствору добавляли равные объемы фенола, перемешивали на вортексе и центрифугировали при 5000 g в течение 5 минут. Водную фазу переносили в новую 50 мл пробирку на льду, после трех раундов выделения хлороформ-изоамиловый спирт (24:1, об/об). Нуклеиновая кислота осаждалась с 1/10 объемами 3 М ацетата натрия
15 (NaAc) (pH 5.3) и 2 объемами 95% (об/об) EtOH. Полученный в результате осадок нуклеиновой кислоты разводили в 10 мл 2 М LiCl при 4°C в течение ночи. Общую РНК осаждали с помощью центрифугирования при 15,000 g в течение 10 минут при 4°C и растворяли в 0.5 мл водного диэтилпилокарбоната (DEPC). После переосаждения с 1/10 объемами 3 М NaAc (pH 5.3) и 2 объемами 95% EtOH, осадок растворяли в 50 до 100
20 мкл водного DEPC. РНК затем обрабатывали с DNase I (Thermo scientific) согласно инструкции производителя. После реакции ДНКазы, образцы очищали с помощью экстракции хлороформ-изоамиловым спиртом, осаждали с 1/10 объемами 3 М NaAc и 2 объемами 95% EtOH, очищали с 70% EtOH, высушивали на воздухе в течение 5 минут и растворяли в воде. Качество РНК анализировали с помощью спектрофотометра ND-
25 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), электрофореза в SB 1%-ном агарозном геле, и ПЦР с праймерами, фланкирующими интрон для проверки наличия контаминации ДНК на агарозном геле.

РНК листа выделяли с triReagent (Sigma), в соответствии с инструкциями производителя. DNaseI (Thermo scientific) применяли согласно инструкциям протокола,
30 и очищали с помощью добавления хлороформ-изоамилового спирта, осаждали с изопропанолом, промывали с 70% EtOH, оставляли в течение 5 минут, чтобы высохнуть на воздухе и растворяли в ddH₂O. Концентрацию РНК определяли с помощью NanoDrop.

Секвенирование РНК

После обработки ДНКазой, образцы РНК проверяли на целостность на 1%-ом
35 агарозном геле, проверяли на чистоту в NanoDrop (260/280 отношение в размере около 2, 260/230 в размере около 2.4), а также отсутствие контаминации ДНК определяли с помощью ПЦР анализа с EF1 α -интрон праймерами.

F-AGGCTGATGTGTGCTGTCCTT - SEQ ID NO: 1;

R-GATGGGAACGAAGGGAATTT - SEQ ID NO: 2.

40 Образцы, содержащие контаминацию ДНК, должны давать ампликоны 391 bp, в отличие от кДНК 303 bp, когда разгоняли на агарозном геле. Образцы, содержащие приблизительно 30 мкг РНК, осаждали с двумя объемами EtOH и 1/10 объема 3 М NaAc и хранили при (-20°C). Создание спираль-специфичных библиотек осуществляли с набором TruSeq RNA Samp Prep Kit FC-121-1031 (Illumina Inc) согласно инструкции
45 производителя. Двенадцать библиотек отправили на сухой лед для секвенирования с Illumina HiSeq2000. Каждая библиотека была отдельно снабжена штрих-кодом и все библиотеки секвенировали в одном треке секвенатора Illumina, получая в среднем 17 \times 10⁶ считываний 50 bp на библиотеку. Считывания Illumina были отсортированы в их

библиотеки и удаляли штрих-коды. Неформатированные чтения были обрезаны для некачественных оснований на концах при секвенировании РНК и чтения низкого качества были удалены при помощи FASTX-набора программ. В результате чтения высокого качества затем были сопоставлены с геномом дыни, применяя TopHat версию v2.0.10 (Kim et al., 2011) и подсчитывались с использованием программного пакета HTseq v0.5.3p3. Bioconductor DESeq (Anders, 2010) в R среде применяли для определения дифференциально экспрессируемых генов между 'sf' и образцами 'дикого типа'. Гены, показывающие $FDR < 0.05$, рассматривались в качестве дифференциально экспрессируемых. Анализ SNP проводили с применением программы порядка определения вариантов GATK Unified Genotyper (версия 2.5-2) (DePristo et al., 2011) и фильтровали до достижения набора SNP высокой достоверности.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (RT-PCR)

1 мкг РНК применяли для синтеза кДНК с использованием 'Verso system' (Thermo Scientific) согласно инструкциям изготовителя. Реакцию осуществляли в Eco RT-PCR системе (Illumina). Каждый образец содержал: 1 мкл кДНК, 0.2 мкл каждого праймера (10 мМ), 5 мкл FastSYBR зеленый мастер-микс реакционной смеси (Applied Biosystems) и 3.6 мкл ddH₂O. Прибор был запрограммирован согласно требованиям производителя фермента. Каждый анализ проводился относительно конститутивного гена ARP1, и анализировали в программном обеспечении Eco версии 4.

Выделение ДНК

Меристемы молодого растения (приблизительно 1 г) измельчали в жидком азоте со ступкой и пестиком. Экстрактный раствор ДНК получали путем смешивания буфера для экстракции (0.35 М сорбитол, 0.1 М Tris, 5 мМ EDTA, pH7, добавляли 0.02 М бисульфит натрия перед использованием): нуклеиновый лизирующий буфер (0.35 М сорбитол, 0.1 М Tris, 5 мМ EDTA, pH7, добавляли 2% СТАВ до использования); 5% саркозил, в соотношении 1:1:0.4. Все химические реактивы поставлялись Sigma. Раствор для экстракции ДНК инкубировали при 65°C. 600 мкл раствора для экстракции ДНК добавляли к 100 мкг ткани, взвешенной в 1.5 мл пробирке, перемешивали и инкубировали при 65°C в течение 10 минут. 600 мкл хлороформ : изоамилового спирта (соотношение 24:1) добавляли, перемешивали в течение 5 минут в 200RPM, центрифугировали при 15,000 g в течение 10 минут и супернатант удаляли в новую пробирку. Холодный изопропанол (2/3 объема супернатанта) добавляли, перемешивали, инкубировали в течение 30 минут всю ночь при (-20°C), центрифугировали при 20,000 g в течение 10 минут, жидкую фазу удаляли, осадок промывали с 70% EtOH, осаждали снова и EtOH удаляли, осадок высушивали на воздухе в течение 5 минут, растворяли с 50-200 мкл воды, добавляли 2 мкл РНКазы, образцы инкубировали при 37°C в течение 30 минут, центрифугировали при 15,000 g в течение 3 минут и супернатант удаляли в новую пробирку. Концентрацию и чистоту ДНК устанавливали на NanoDrop, целостность ДНК проверяли на 0.8%-ном агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение супер-плодового растения

Проводили визуальное определение фенотипа 2,000 M₂ семейств, полученных из семян, подвергавшихся мутагенезу, линии разведения 'CEZ'. Каждое M₂ семейство было представлено в природных условиях 12 растениями. Одно семейство отделяли для уникального фенотипа; 3 из 12 растений, выращиваемых в природных условиях, несли более чем 15 плодов на растение (Фигуры 1 и 2) по сравнению с растениями дикого типа, которые несли в среднем 3 плода. Каждый мутантный плод весил в среднем 300 г, тогда как плод дикого типа весил приблизительно 900 г. Интересно, что мутантный

плод был без семян или были очень маленькие пустые семена. Эта мутация называется в контексте настоящего изобретения как 'супер плодвое' (Фигура 3). Когда плод 'sf' растения разводили, плод оставался маленьким.

Наследование свойств супер плодового растения

5 Побег супер плодовых растений ('sf') переносили в теплицу как только они развили достаточно корни, 'sf' растения, произошедшие из побега, не могут быть самоопыляемыми. Однако их пыльца применяется для успешного опыления 'CEZ', 'Noy Yizre'el', 'Ein Dor' и 'Piel De Sapo' линий и получали жизнеспособные F₁ семена. Эти семена были посажены и F₁ растения были успешно самоопыляемыми с образованием F₂ семян.
10 150-200 растений каждой из F₂ популяций были посажены в природных условиях, позволяли им расти в соответствии с коммерческими условиями производства и перекрестноопылялись пчелами. После того, как получали плод авторы настоящего изобретения могли визуальнo проводить отличия между фенотипами 'sf' и дикого типа.
15 Во всех четырех F₂ популяциях 'sf' отделяли как единичный рецессивный ген (Таблица 1).

Таблица 1

F ₂ популяция	n	фенотип	Наблюдаемый	Ожидаемый	Chi квадрат	P значение
ED x sf	188	sf	43	47	0.454	0.5005
		WT	145	141		
NY x sf	166	sf	39	41.5	0.201	0.6541
		WT	127	124.5		
CEZ x sf	191	sf	48	47.75	0.002	0.9667
		WT	143	143.25		
PDS x sf	194	sf	38	48.5	3.031	0.0817
		WT	156	145.5		

20 Значение Chi квадрата отклонения сегрегантов от 1:3 ожидаемое менделевское отношение. 'n' – размер популяции; P значение, которое более чем 0.05 указывает, что существует высокая вероятность того, что наблюдаемые отклонения могут быть связаны только со случайностью.
25
30
35

Для оценки выхода 'sf', авторы настоящего изобретения измеряли количество плодов и массу всех 'sf' растений, делили сумму плодов на количество растений для получения среднего количества плодов на растении, делили сумму веса плодов на количество растений для получения среднего выхода на растение и делили сумму веса плодов на количество растений для получения среднего веса плода. Подобные измерения и расчеты проводили для растений дикого типа. Во всех исследуемых генетический фон 'sf' содержал значительно больше плодов (Фигура 4А), значительно меньше плодов (Фигура 4В) и значительно больше урожая на растение (Фигура 4С).
40

Для определения влияния 'sf' на качество плода, авторы настоящего изобретения в случайном порядке отбирали 10 зрелых плодов CEZ и CEZx'sf' дикого типа и фенотипа сегрегантов 'sf'. Плод пробовали на вкус, анализировали на общее количество растворимых твердых веществ (TSS) как показателя содержания сахара, анализировали ВЭЖХ на содержание β-каротина. Не было обнаружено влияния 'sf' на аромат плода
45

дыни, который в основном определялся содержание сахара. Разницы в качестве не было обнаружено между сегрегантами 'sf', дикого типа или 'CEZ', включая содержание TSS или β -каротина (Фигуры 5А-В).

Для установления гена, который определяет фенотип 'sf', два повтора из 10 растений, показывающих фенотип либо 'sf' или дикого типа в 'sf X NY и в 'sf X ED выделенных F₂ популяций, 'sf' фенотип от 'sf X CEZ выделенной F₂ популяции и 'sf' источник линии, CEZ были выбраны. Для каждого из этих растений меристемы побегов растений, стеблей, женских цветов и завязей плодов в возрасте 2-4 дней после опыления были отобраны. РНК выделяли из основного объема каждого сочетания ткани x фенотипа. Равные количества РНК из всех тканей были объединены для развития двух повторов фенотипов 'sf' и дикого типа 'sf X NY и 'sf X ED выделенных F₂ популяций (восемь пулов), фенотип 'sf' от 'sf X CEZ выделенной F₂ популяции и 'sf' источника линии, CEZ (четыре пула). Двенадцать библиотек были анализированы секвенированием РНК с Illumina HiSeq 2000, получая в среднем 17X10⁶ считываний для каждой библиотеки. Единичный нуклеотидный полиморфизм (SNP) устанавливали путем сравнения данных секвенирования РНК фенотипических пулов, полученных от 'sf X NY и 'sf X ED выделенных F₂ популяций, были рассеяны вдоль генома дыни, однако большинство из них располагалось на каркасе 11. Авторы настоящего изобретения затем искали SNP, которые были гомозиготными в 'CEZ', несущие альтернативный аллель во всех 'sf' фенотипах' и несущие главным образом 'CEZ' аллель в фенотипах дикого типа. Единичный SNP в MELO3C009603, который расположен на каркасе 11 хромосомы 4, фиксировали во всех 'sf' материалах ('А') по сравнению с 'CEZ' ('Т') и был минорным аллелем во всех фенотипах 'дикого типа'.

Праймеры были разработаны так, что при ПЦР амплифицировался фрагмент длиной 213bp, который имел AroI сайт рестрикции в аллеле дикого типа, который мутировал в sf.

F TAGACATGAGCCGCATCTGA - SEQ ID NO: 3

R GAACGTGGCAACAACAACA - SEQ ID NO: 4

Проведенное AroI расщепление на фрагментах, амплифицированных ПЦР, приводило к 140bp и 73bp фрагментам у дикого типа, 213 bp фрагмент, когда расщепляли гомозиготный 'sf' мутант, и все три полосы в гетерозиготе (Фигура 6В). Этот маркер показывал полное совместно отделение с 'sf' фенотипом в четырех независимых F₂ популяциях, состоящих из, по меньшей мере 300 растений каждая.

MELO3C009603 кодирует Cys₂ His₂ цинковый палец (ZF) белка. Трансверсия 'Т' на 'А' изменила ТТС, который кодирует высококонсервативный фенилаланин аминокислоты в положении 97 (F⁹⁷), в АТС, который кодирует изолейцин (I) в ZF мотиве (Фигура 7).

Данные секвенирования РНК показали, что цифровая экспрессия MELO3C009603 является низкой, только 40-60 считывались на каждый объем, и похожие в обоих объемах. Эти объемы включали смесь нескольких тканей. Анализировали относительную экспрессию MELO3C009603 в каждой из этих тканей с применением количественной RTPCR и было установлено, что она имела похожую низкую экспрессию в листьях и похожую очень низкую экспрессию во всех других анализируемых тканях (Фигуры 8А-В).

Данные секвенирования РНК для дифференциально экспрессирующихся генов (DEG) установили 103 генов, которые показали более чем в два раза изменения между 'CEZ'

и 'sf', изогенное сравнение. Только 55 генов, из этих 103, показали значительную разницу при использовании установленного значения Р из этих 55 только 14 генов показали значительную разницу экспрессии между объемами 'sf' и 'дикого типа' во всех трех анализируемых выделенных популяциях (Фигура 9 и Таблица 2, ниже в настоящем изобретении). Из этих 14 генов только MELO3C021150, который кодирует гомолог нуцеллус-специфического белка семян, подавлены в 'sf' всех трех анализируемых популяции и MELO3C003230, который кодирует предполагаемого гомолога 5-ароматической ацилтрансферазы антоциана, были активированы в 'sf' анализируемых популяциях. Остальные двенадцать генов показали похожие направления изменения в 'CEZ x sf' и в 'ED x sf', но противоположное направление в 'NY x sf' F₂ популяции (Таблица 2, ниже в настоящем изобретении). Количественный RT-PCR анализ MELO3C021150 различных органов показал, что цифровая экспрессия, найденная между объемами, внесена молодой тканью плодов и что MELO3C021150 не транскрибируется во всех других тканях (Фигура 10).

15

20

25

30

35

40

45

Таблица 2

C	S u b - C	ID	C E Z sf	C E Z W T	W T/ sf	P	A dj P	E D sf	E D W T	W T/ sf	P	A dj P	N Y sf	N Y W T	W T/ sf	P	A dj P	ACC	DESC	
5	1	AAA	MELO3 C021150	2.5	13.9.5	56.5	0.0000	0.0000	1.9	20.4	10.6	0.0001	0.0130	1.1	36.8	32.2	0.0000	0.0000	AA823 29	Нуцеллус-специфический белок семян [Citrullus lanatus]
10	1	AAA	MELO3 C003230	9.53.6	33.1.1	0.3	0.0000	0.0009	95.3.6	25.3.4	0.4	0.0000	0.0003	1.27.1	34.6.0	0.3	0.0000	0.0002	XP_002 531355	5-ароматическая ацилтрансфераза антоциана, предполагаемый [Ricinus communis]
15	2	AA	MELO3 C022716	3.9	24.7.2	63.4	0.0000	0.0000	1.4	7.8	5.6	0.0486	1.0000	5.2	46.9	9.0	0.0000	0.0003	AA823 29	нуцеллус-специфический белок семян [Citrullus lanatus]
20	2	AA	MELO3 C023027	2,064.6	40.1.0	0.2	0.0000	0.0000	2,064.6	66.8.2	0.5	0.0001	0.0239	82.1.0	43.7.8	0.5	0.0152	0.4081	AAM74 923	17 kDa флэмный лектин Lec17-1 [Cucumis melo]
25	2	AA	MELO3 C015490	17.0.1	35.7	0.2	0.0000	0.0000	17.0.1	59.1	0.6	0.0486	1.0000	25.6.8	80.2	0.3	0.0001	0.0059	XP_002 514129	Кальмодулин - связывающий белок, предполагаемый [Ricinus communis]
30	2	AA	MELO3 C027040	1,176.0	35.2.7	0.3	0.0000	0.0001	1,176.0	36.3.7	0.3	0.0000	0.0000	55.9.6	33.3.6	0.6	0.0500	0.8348	AAM74 923	17 kDa флэмный лектин Lec17-1 [Cucumis melo]
35	2	AA	MELO3 C024762	36.5.0	11.1.0	0.3	0.0000	0.0004	36.5.0	70.4	0.3	0.0000	0.0010	17.6.8	80.6	0.5	0.0064	0.2300	AAW51 125	Предполагаемый спирт ацил-трансферазы [Cucumis melo]
40	2	AA	MELO3 C007337	54.3	10.5	0.2	0.0000	0.0017	54.3	25.7	0.5	0.0187	0.7167	13.2.5	45.1	0.3	0.0006	0.0374	ADL366 65	COL доменный класс фактора транскрипции [Malus x domestica]
45	2	AA	MELO3 C006043	46.8.3	16.7.9	0.4	0.0000	0.0024	46.8.3	23.5.6	0.6	0.0062	0.3771	69.5.8	25.0.4	0.4	0.0002	0.0140	ADN34 176	UDP-глюкоза:глюкозилтрансфераза

C	Sub-C	ID	CEZsf	CEZW T	WT/sf	P	A dj P	EDsf	EDW T	WT/sf	P	A dj P	NYsf	NYW T	WT/sf	P	A dj P	ACC	DESC	
																			[Cucumis melo подвид. melo]	
5	2	A	MELO3 C026488	468.8	198.2	0.4	0.0004	0.0201	468.8	113.2	0.4	0.0002	0.0299	401.8	191.0	0.5	0.0068	0.2404	O49858	RecName: целая=цитохром P450 82A3; AltName: целая=цитохром P450 CP6
10	2	A	MELO3 C002560	452.8	66.6	0.1	0.0000	0.0000	452.8	59.1	0.6	0.0372	1.0000	151.3	92.8	0.6	0.0966	1.0000	AAAY85179	Клетковина - экспрессируемый белок [Gossypium hirsutum]
15	2	A	MELO3 C007961	17.9	127.3	7.1	0.0000	0.0000	17.9	36.7	3.3	0.0010	0.1077	9.9	16.1	1.6	0.3521	1.0000	BAV40817	эндохитиназа MCHT-2 [Cucumis melo]
20	2	A	MELO3 C008466	167.9	32.1	0.2	0.0000	0.0000	167.9	9.9	0.4	0.0304	0.9321	42.3	18.7	0.4	0.0363	0.6980	XP_002520298	Кальций-связывающий белок/cast, предполагаемый [Ricinus communis]
25	2	A	MELO3 C013917	206.2	53.5	0.3	0.0000	0.0001	206.2	56.2	0.6	0.0296	0.9195	248.0	102.3	0.4	0.0021	0.0950	ADE41101	AP2 доменный класс фактора транскрипции [Malus x domestica]
30	2	A	MELO3 C023255	66.5	13.8	0.2	0.0000	0.0008	66.5	43.3	0.6	0.0665	1.0000	66.7	32.9	0.5	0.0358	0.6926	XP_002328473	Ожидаемый белок [Populus trichocarpa]
35	2	A	MELO3 C005711	353.7	125.2	0.4	0.0000	0.0031	353.7	181.9	0.5	0.0017	0.1555	606.4	293.8	0.5	0.0075	0.2576	XP_002509857	Ион металла, связывающий белок, предполагаемый [Ricinus communis]
40	2	A	MELO3 C011268	8.5	38.2	4.5	0.0003	0.0176	8.5	43.2	1.9	0.0380	1.0000	5.1	19.5	3.8	0.0173	0.4476	XP_002515504	АТФ связывающий белок, предполагаемый [Ricinus communis]
45	2	A	MELO3 C021821	198.7	77.7	0.4	0.0004	0.0233	198.7	187.6	1.7	0.0236	0.8141	257.9	127.4	0.5	0.0127	0.3633	XP_002328950	Гликозилтрансфераза, CAZy семейство GT2 [Populus trichocarpa]
	2	A	MELO3 C026807	102.0	37.3	0.4	0.0007	0.0331	102.0	30.1	0.5	0.0412	1.0000	2.2	1.3	0.6	0.8120	1.0000		

5
10
15
20
25
30
35
40
45

C	Sub-C	ID	CEZsf	CEZWT	WT/sf	P	A dj P	EDsf	EDWT	WT/sf	P	A dj P	NYsf	NYWT	WT/sf	P	A dj P	ACC	DESC
1	B B B	MELO3 C003917	9 2 4. 3	42. 2	0. 0	0. 00 00	0. 00 00	92 4.3	14. 1	0. 0	0. 00 00	0. 00 00	60. 4	3,4 50. 8	57 .1	0. 00 00	0. 00 00	ACC939 47	Белок теплового шока70 [Hevea brasiliensis]
1	B B B	MELO3 C027124	8 5 3. 0	41. 8	0. 0	0. 00 00	0. 00 00	85 3.0	9.5	0. 1	0. 00 00	0. 00 00	40. 4	3,2 90. 9	81 .4	0. 00 00	0. 00 00	ADM47 405	Малый молекулярн ый белок теплового шока [Nicotiana tabacum]
1	B B B	MELO3 C025139	1, 8 5 2. 7	18 9.9	0. 1	0. 00 00	0. 00 00	1,8 52. 7	15 7.4	0. 4	0. 00 00	0. 00 13	5,7 92. 0	25 .9	0. 00 00	0. 00 00	ADM47 405	Малый молекулярн ый белок теплового шока [Nicotiana tabacum]	
1	B B B	MELO3 C021172	4, 6 9 7. 3	67 3.7	0. 1	0. 00 00	0. 00 00	4,6 97. 3	1,1 60. 9	0. 5	0. 00 02	0. 03 15	1,5 99. 9	3,8 78. 2	2. 4	0. 00 07	0. 04 30	XP_002 880227	Атаноген, ассоцииров анный с BCL-2- [Arabidopsis lyrata подвид lyrata]
1	B B B	MELO3 C002020	5, 7 5 6. 5	1,1 31. 6	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	5,7 56. 5	20 6.6	0. 4	0. 00 00	0. 00 32	33 7.1	1,6 08. 5	4. 8	0. 00 00	0. 00 00	AAX08 108	Белок теплового шока 101 [Vitis vinifera]
1	B B B	MELO3 C026374	8 5 7. 8	15 7.0	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	85 7.8	48. 3	0. 4	0. 00 03	0. 03 91	73. 0	58 5.7	8. 0	0. 00 00	0. 00 00	ADM47 405	Малый молекулярн ый белок теплового шока [Nicotiana tabacum]
1	B B B	MELO3 C006933	2 5 2. 0	37. 4	0. 1	0. 00 00	0. 00 00	25 2.0	1.7	0. 1	0. 00 01	0. 01 92	11. 6	88. 8	7. 7	0. 00 00	0. 00 00	XP_002 318188	Ожидаемый белок [Populus trichocarpa]
1	B B B	MELO3 C003195	1 0 7. 3	16. 5	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	10 7.3	6.1	0. 0	0. 00 00	0. 00 00	13. 4	57. 2	4. 3	0. 00 02	0. 01 79	XP_002 534180	Белок теплового шока, предполагае мый [Ricinus communis]
1	B B B	MELO3 C006935	9, 8 5 3. 8	2,8 44. 1	0. 3	0. 00 00	0. 00 00	9,8 53. 8	18 6.1	0. 4	0. 00 01	0. 01 80	32 5.9	3,1 82. 2	9. 8	0. 00 00	0. 00 00	XP_002 513649	Белок теплового шока, предполагае мый [Ricinus communis]
C	Sub-C	ID	CEZsf	CEZWT	WT/sf	P	A dj P	EDsf	EDWT	WT/sf	P	A dj P	NYsf	NYWT	WT/sf	P	A dj P	ACC	DESC
1	B B B	MELO3 C022499	3 0 7. 3	79. 1	0. 3	0. 00 00	0. 00 00	30 7.3	4.5	0. 2	0. 00 03	0. 03 91	16. 3	13 6.2	8. 4	0. 00 00	0. 00 00	XP_002 320721	Ожидаемый белок [Populus trichocarpa]

C	S u b - C	ID	C E Z s f	C E Z W T	W T/ s f	P	A d j P	E D s f	E D W T	W T/ s f	P	A d j P	N Y s f	N Y W T	W T/ s f	P	A d j P	ACC	DESC
5	1	B B B MELO3 C010773	6 5. 0	17. 9	0. 3	0. 00 02	0. 01 16	65. 0	40. 3	0. 4	0. 00 01	0. 02 17	9.7	90. 7	9. 4	0. 00 00	0. 00 00	ABH029 12	MYB фактор транскрип ции MYB71 [Glycine max]
10	1	B B B MELO3 C002508	8 6 6. 4	36 6.8	0. 4	0. 00 03	0. 01 66	86 6.4	29 5.6	0. 5	0. 00 01	0. 01 64	30 2.3	98 8.6	3. 3	0. 00 00	0. 00 11	AAD33 596	Тиоредокси н h [Hevea brasiliensis]
15	2	B B MELO3 C022116	1, 0 0. 9	32. 6	0. 0	0. 00 00	0. 00 00	21. 3	4.3	0. 2	0. 00 20	0. 17 45	6.7	1.5 14. 5	22 5. 7	0. 00 00	0. 00 00	XP_002 519929	Белок теплового шока, предполага емый, [Ricinus communis]
20	2	B B MELO3 C018485	6 8 1. 3	37. 2	0. 1	0. 00 00	0. 00 00	68 1.3	13. 7	0. 5	0. 05 65	1. 00 00	11. 9	43 7.1	36 8	0. 00 00	0. 00 00	XP_002 521274	Белок теплового шока, предполага емый [Ricinus communis]
25	2	B B MELO3 C025135	1, 2 4 5. 0	10 3.4	0. 1	0. 00 00	0. 00 00	1,2 45. 0	7.6	0. 5	0. 16 67	1. 00 00	11. 3	46 7.9	41 4	0. 00 00	0. 00 00	AAD49 336	Низкомолек улярный белок теплового шока [Nicotiana tabacum]
30	2	B B MELO3 C018023	1, 2 3 2. 5	18 4.1	0. 1	0. 00 00	0. 00 00	1,2 32. 5	59. 2	0. 5	0. 00 41	0. 28 15	10 8.7	29 5.7	2. 7	0. 00 05	0. 02 91	ADN33 815	Белок, связывающ ий стеролрегу лирующие элементы 2 сайта протеазы [Cucumis melo]
35	2	B B MELO3 C004433	1, 7 9 4. 3	27 9.2	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	1,7 94. 3	35 2.3	0. 6	0. 00 24	0. 20 14	53 2.9	1,2 63. 8	2. 4	0. 00 12	0. 06 08	XP_002 531446	Ионы кальция, связывающ ие белок, предполага емый [Ricinus communis]
40	2	B B MELO3 C024086	1, 4 6 9. 6	25 5.5	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	1,4 69. 6	73. 1	0. 6	0. 04 18	1. 00 00	12 2.4	44 6.5	3. 6	0. 00 00	0. 00 06	XP_002 526446	Белок теплового шока, предполага емый [Ricinus communis]
45	2	B B MELO3 C006536	4 1 5. 6	62. 4	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	41 5.6	24. 7	0. 4	0. 00 37	0. 26 35	30 0	18 5.6	6. 2	0. 00 00	0. 00 00	NP_001 148098	70 kDa Белок теплового шока 1 [Zea mays]

C	S u b - C	ID	C E Z s f	C E Z W T	W T/ s f	P	A d j P	E D s f	E D W T	W T/ s f	P	A d j P	N Y s f	N Y W T	W T/ s f	P	A d j P	ACC	DESC	
5	2	B B	MELO3 C015515	6 0. 2	39 3.2	6. 5	0. 00 00	0. 00 00	60. 2	1,8 46. 2	1. 7	0. 00 66	0. 39 58	45 6.6	1,0 31. 6	2. 3	0. 00 16	0. 07 74	Q9ZRA 4	RecName: Целый=аук син- связывающ ий белок ABP19a; Flags: Precursor
10	2	B B	MELO3 C003177	2 7 1. 8	40. 9	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	27 1.8	43. 0	0. 4	0. 00 26	0. 21 08	40. 0	73. 1	1. 8	0. 07 59	1. 00 00	XP_002 534074	Пептид переносчик, предполагае мый [Ricinus communis]
15	2	B B	MELO3 C016897	5, 1 9 6. 4	1,1 90. 0	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	5,1 96. 4	70. 3	0. 6	0. 01 56	0. 65 27	11 1.7	6,4 77. 3	58 .0	0. 00 00	0. 00 00	ACV932 50	СII малый белок теплового шока 1 [Prunus salicina]
20	2	B B	MELO3 C015804	1, 4 9 5. 2	37 2.0	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	1,4 95. 2	19. 5	0. 6	0. 07 51	1. 00 00	29. 8	50 0.7	16 .8	0. 00 00	0. 00 00	XP_002 517070	Фактор теплового шока белка HSF30, предполагае мый [Ricinus communis]
25	2	B B	MELO3 C003331	2 8 3. 8	62. 0	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	28 3.8	31. 0	0. 6	0. 11 65	1. 00 00	24. 3	29. 0	1. 2	0. 65 88	1. 00 00	XP_002 873020	Гипотетиче ский белок ARALYDR AFT_48695 6 [Arabidopsis lyrata подвид lyrata]
30	2	B B	MELO3 C003331	2 8 3. 8	62. 0	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	28 3.8	31. 0	0. 6	0. 11 65	1. 00 00	24. 3	29. 0	1. 2	0. 65 88	1. 00 00	XP_002 873020	Гипотетиче ский белок ARALYDR AFT_48695 6 [Arabidopsis lyrata подвид lyrata]
35	2	B B	MELO3 C004434	6 8 5. 6	18 5.5	0. 3	0. 00 00	0. 00 00	68 5.6	22 7.2	0. 4	0. 00 01	0. 01 55	30 8.5	69 7.6	2. 3	0. 00 24	0. 10 76	ADN34 124	Серин- насыщенны й белок [Cucumis melo подтип melo]
40	2	B B	MELO3 C019254	9 0. 8	28 4.0	3. 1	0. 00 00	0. 00 09	90. 8	48. 8	1. 6	0. 10 36	1. 00 00	82. 6	49. 9	0. 6	0. 12 11	1. 00 00	BAC796 16	предполагае мый Мембрано- способству ющий GTP- связывающ ий белок 1 (GTPase spg1) [Oryza sativa]

C	S ub - C	ID	C E Z sf	C E Z W T	W T/ sf	P	A dj P	E D sf	E D W T	W T/ sf	P	A dj P	N Y sf	N Y W T	W T/ sf	P	A dj P	ACC	DESC	
5	2	B B	MELO3 C023497	2 5. 5	2.0	0. 1	0. 00 00	0. 00 12	25. 5	11. 1	0. 6	0. 28 83	1. 00 00	13. 0	22. 9	1. 8	0. 23 33	1. 00 00	XP_002 531706	Предшественник неспецифического белка-переносчика липидов, предполагаемый [Ricinus communis]
10	2	B B	MELO3 C005923	3 0 3. 6	10 6.8	0. 4	0. 00 00	0. 00 27	30 3.6	61. 0	0. 3	0. 00 00	0. 00 01	96. 1	16 6.3	1. 7	0. 06 43	0. 93 95	XP_002 867485	Малый белок теплового шока хлоропласта [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]
15	2	B B	MELO3 C025085	5 2 8. 1	19 8.5	0. 4	0. 00 01	0. 00 39	52 8.1	26. 7	0. 5	0. 01 31	0. 58 72	39. 0	26 3.1	6. 7	0. 00 00	0. 00 00	BAG093 78	Пероксисомальный малый белок теплового шока [Glycine max]
20	2	B B	MELO3 C005629	1 7 5. 4	58. 9	0. 3	0. 00 01	0. 00 60	17 5.4	14 9.4	2. 2	0. 00 10	0. 10 65	55. 5	15 8.3	2. 9	0. 00 04	0. 02 71	ABH087 46	СВФ/DREB-подобный фактор транскрипции 1 [Citrus trifoliata]
25	2	B B	MELO3 C002513	5 1 9. 6	20 6.1	0. 4	0. 00 01	0. 00 93	51 9.6	50. 8	0. 5	0. 00 77	0. 43 30	82. 5	28 8.2	3. 5	0. 00 00	0. 00 16	NP_567 623	Альдолаза-тип Т1М баррель семейства белков [Arabidopsis thaliana]
30	2	B B	MELO3 C024263	1 8 2. 0	67. 9	0. 4	0. 00 03	0. 01 67	18 2.0	54. 9	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	79. 7	15 4.0	1. 9	0. 02 50	0. 56 32	XP_002 515999	Внутренний белок тонопласта, предполагаемый [Ricinus communis]
35	2	B	MELO3 C020963	3 3 8. 8	87. 0	0. 3	0. 00 00	0. 00 00	33 8.8	15 5.9	1. 7	0. 01 50	0. 63 59	51 0.2	10 6.9	0. 2	0. 00 00	0. 00 00	XP_002 533354	WRKY фактор транскрипции, предполагаемый [Ricinus communis]
40	2	B	MELO3 C021168	1 0 8. 2	24 6.0	2. 3	0. 00 11	0. 04 95	10 8.2	11 4.0	2. 3	0. 00 09	0. 09 74	12 5.8	75. 2	0. 6	0. 09 21	1. 00 00	XP_002 511954	Предшественник эстеразы, предполагаемый [Ricinus communis]
45	2	B	MELO3 C011948	6 8. 4	20. 8	0. 3	0. 00 04	0. 02 01	68. 4	21. 4	1. 7	0. 22 73	1. 00 00	33. 6	13. 0	0. 4	0. 02 58	0. 57 67	XP_002 530026	Белок, содержащий богатые лейцином повторы,

C	S u b - C	ID	C E Z sf	C E Z W T	W T/ sf	P	A dj P	E D sf	E D W T	W T/ sf	P	A dj P	N Y sf	N Y W T	W T/ sf	P	A dj P	ACC	DESC
																			предполагае мый [Ricinus communis]
2	B	MELO3 C003911	2 6 1. 9	11 2.4	0. 4	0. 00 09	0. 04 01	26 1.9	29 4.5	1. 8	0. 00 42	0. 28 51	46 3.2	26 8.1	0. 6	0. 04 41	0. 77 27	XP_002 512304	копин, предполагае мый [Ricinus communis]

Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано в связи с конкретными вариантами осуществления его, очевидно, что многие альтернативы, модификации и варианты будут очевидны для специалиста в данной области техники. Соответственно, предполагается охватить все такие альтернативы, модификации и варианты, которые попадают в пределы сущности и широкий объем настоящего изобретения.

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в описании настоящего изобретения, включены в своей полноте посредством ссылки в настоящее описание, в равной степени как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была конкретно и отдельно указана, что она включена в настоящее изобретение посредством ссылки. Кроме того, цитирование или идентификация любой ссылки в данной заявке не должно быть истолковано как признание того, что такая ссылка доступна в качестве предшествующего уровня техники для настоящего изобретения. В той степени, в которой используются заголовки разделов, они не должны быть истолкованы как обязательные ограничения.

ССЫЛКИ

Anders S (2010). Analysing RNA-Seq data with the DESeq package. *Molecular biology*, 1-17.

Cabezas JA, Cervera MT, Ruiz-Garcia L, Carreño J, Martinez-Zapater JM (2006) A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome*, 49: 1572-1585.

Cowan AK, Cripps RF, Richings EW, Taylor NJ (2001) Fruit size: towards an understanding of the metabolic control of fruit growth using avocado as a model system. *Physiologia Plantarum*, 111: 127-136.

Dathan N, Zaccaro L, Esposito S, Isernia C, Omichinski JG, Riccio A, ... Pedone, P V (2002). The Arabidopsis SUPERMAN protein is able to specifically bind DNA through its single Cys2-His2 zinc finger motif. *Nucleic acids research*, 30: 4945-4951

DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, ... & Daly MJ (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics*, 43 (5), 491-498.

Gidoni D, Carmi N (2007) Mutagenesis for seedlessness in Citrus. *Israel J. Plant Sci.* 55: 133-135.

Grumet R, Katzir N, Little HA, Portnoy V, Burger Y (2007) New insights into reproductive development in melon (*Cucumis melo* L.). *Intl J Plant Developmental Biol*: 253-264.

Jiang CJ, Aono M, Tamaoki M, Maeda S, Sugano S, Mori M, Takatsuji H (2008) SAZ, a new SUPERMAN-like protein, negatively regulates a subset of ABA-responsive genes in Arabidopsis. *Molecular Genetics and Genomics*, 279: 183-192.

Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*, 14: R36.

Klug A (2010) The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and

genome manipulation. Annual review of biochemistry, 79: 213-231.

Klug A, Schwabe JW (1995) Protein motifs 5. Zinc fingers. The FASEB journal, 9: 597-604.

Lee MS, Gippert GP, Soman KV, Case DA, Wright PE (1989) Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. Science, 245: 635-637.

5 Liu QL, Xu KD, Ma N, Zhao LJ, Xi L (2014) Overexpression of a novel chrysanthemum SUPERMAN-like gene in tobacco affects lateral bud outgrowth and flower organ development. Plant Physiology and Biochemistry 77: 1-6.

10 **Mejía N**, Soto B, Guerrero M, Casanueva X, Houel C, de los **Ángeles** Miccono, M, Adam-Blondon AF (2011) Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenospermocarpic seedlessness in grapevine. BMC plant biology, 11: 57.

Menda N, Semel Y, Peled D, Eshed Y, Zamir D (2004) In silico screening of a saturated mutation library of tomato. Plant J. 38: 861-872.

15 Papadopoulou E, Little HA, Hammar SA, Grumet R (2005) Effect of modified endogenous ethylene production on sex expression, bisexual flower development and fruit production in melon (*Cucumis melo* L.). Sexual plant reproduction, 18: 131-142.

Tadmor Y, Larkov O, Meir A, Minkoff M, Lastochkin E, Edelstein E, Levin S, Wong J, Rocheford T, and Lewinsohn E. (2000) Reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of vitamin E components in maize kernels. Phytochem. Anal. 11: 370-374

20 Tadmor Y, King S, Levi A, Davis A, Meir A, Wasserman B, Hirschberg J, and Lewinsohn E. (2005) Comparative fruit colouration in watermelon and tomato. Food Res. Int. 38: 837-841.

Tadmor Y, Katzir N, Meir A, Yaniv-Yaakov A, Sa'ar U, Baumkoler F, Lavee T, Lewinsohn E, Schaffer AA, Burger J (2007) Induced mutagenesis to augment the natural genetic variability of melon (*Cucumis melo* L.). Israel J. Plant Sci. 55: 159-169.

25 (57) Формула изобретения

1. Растение *Cucumis melo*, имеющее мутацию потери функции, по меньшей мере, в одном аллеле SEQ ID NO: 7, причем растение способно производить более чем 12 плодов, где указанные плоды являются бессемянными.

30 2. Растение по п. 1, имеющее подобное содержание общего количества растворимых твердых веществ (TSS) и содержание β -каротина как в растении *Cucumis melo* дикого типа или отличающееся тем, что вес общего количества плодов указанного растения больше, чем вес общего количества плодов растения *Cucumis melo* дикого типа.

3. Растение по п. 1, отличающееся тем, что обе аллели SEQ ID NO: 7 генома растения имеют мутацию потери функции, которая приводит к бессемянному признаку.

35 4. Растение по п. 3, отличающееся тем, что обе аллели указанного SEQ ID NO: 7 имеют F/I мутацию в положении 97.

5. Способ маркер-вспомогательной селекции *C. melo* растения, способного производить более чем 5 бессемянных плодов, где способ включает в себя:

40 (i) проведение анализа на наличие маркера мутации потери функции, по меньшей мере, в одном аллеле SEQ ID NO: 7 растения, отличающийся тем, что наличие указанной мутации указывает на то, что растение способно производить более чем 5 бессемянных плодов, и

(ii) селекцию растения с указанным маркером.

45 6. Способ маркер-вспомогательной селекции *C. melo*, имеющего потомство, способное производить более чем 5 бессемянных плодов, где способ включает в себя:

(i) проведение анализа на наличие маркера мутации потери функции, по меньшей мере, в одном аллеле SEQ ID NO: 7 растения, отличающийся тем, что наличие указанной мутации указывает на то, что потомство способно производить более чем 5 бессемянных

плодов, и

(ii) селекцию растения с указанным маркером.

7. Пищевой продукт, включающий в себя растение по любому из пп. 1-4.

8. Переработанный пищевой продукт, содержащий растение по любому из пп. 1-4.

5 9. Часть растения *Cucumis melo* для производства растения *Cucumis melo*, способного производить более чем 12 плодов, где указанные плоды являются бессемянными, где часть растения имеет мутацию потери функции, по меньшей мере, в одном аллеле SEQ ID NO: 7.

10. Часть растения по п. 9, представляющее собой побег или семя.

10 11. Переработанный пищевой продукт, содержащий часть растения по п. 9.

15

20

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ЗЕ СТЕЙТ ОФ ИЗРАИЛ, МИНИСТРИ ОФ ЭГРИКАЛЧЕ ЭНД РУРАЛ ДЕВЕЛОПМЕНТ,
ЭГРИКАЛЧЕРАЛ РИСЕЧ ОРГАНИЗЕЙШН (АРО) (ВОЛКАНИ СЕТНЭ)

ТАДМОР, Яаков
БУРГЕР, Йосеф
МЕЙР, Айяла
СААР, Узи
БАУМКОЛЕР, Фабиан
ШАФФЕР, Артур А.
КАЦИР, Нурит
ОЗ, Идо
ЛАВИ, Тамар

<120> РАСТЕНИЯ ДЫНИ С ПОВЫШЕННОЙ УРОЖАЙНОСТЬЮ ПЛОДОВ

<130> 62040

<150> US 61/950,315

<151> 2014-03-10

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> single strand DNA oligonucleotide

<400> 1

aggctgattg tgctgtcctt

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> single strand DNA oligonucleotide

<400> 2

gatgggaacg aaggaattt

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> single strand DNA oligonucleotide

<400> 3

tagacatgag cgcacatctga

20

2

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 4
 gaacgtggca acaacaaca
 20

<210> 5
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Amino Acid sequence encoding the WT ZF motif of 'sf'
 (MELO3C009603)

<400> 5
 Cys His Tyr Cys Cys Arg Asn Phe Pro Thr Ser Gln Ala Leu Gly Gly
 1 5 10 15

His Gln Asn Ala His
 20

<210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Amino Acid sequence encoding mutated ('F97' to 'I' amino acid
 change) ZF motif of 'sf' (MELO3C009603)

<400> 6
 Cys His Tyr Cys Cys Arg Asn Ile Pro Thr Ser Gln Ala Leu Gly Gly
 1 5 10 15

His Gln Asn Ala His
 20

<210> 7
 <211> 1142
 <212> DNA
 <213> Cucumis melo

<400> 7
 tcttcctttt cttcttctt cttcttctt tctgcccga accgattgat attaattctc
 60

tctcgggtgg cggcataggt ttttcaaac cccacggccc caacaccacc atatacactt
 120

3

tcatggacaa gaggaccagt gaacgagaga ctcattgattt catgaacgtc gaggcttttct
 180
 ctcaacttcc cttcatccgt cctgcaccaa aagaaaaggg cattaggcctt ttcgggatag
 240
 aatttggag tcgaaacgct gctaccgtct cgccttcttc cattgaggaa tcagatgctg
 300
 gtgaaactgt tattgcatgc gaagatgcga aagaaaacaa caacgatggc aacaacaaca
 360
 acggcgagaga aagtagccgg agatttgaat gtcattactg ttgtagaaat ttcctactt
 420
 ctcaagcctt aggaggacac caaatgctc acaaaagaga gcgccaacat gcaaaaaggg
 480
 ctcaccttca gtctaacgca gccgctatgg ttcattggaat tggacccttt tcagatgctg
 540
 ctcattgtcta tggcctcatg aactaccaac gcctaggcgc tactcacctt aataattacc
 600
 cttcttggaa tagaaattcg ccagcagcaa cggctgctgc tgctgctgct acaagatttt
 660
 acggtagctc tggtagggcag tattcgtcgg cagcaaccgc gacgcctata aacgggagcc
 720
 cgttggcgat gtggagaatc tcggccgttc aaaatagtaa tgtaccgtca tcgtttggcg
 780
 gtcgggagcg gtcgtctcta caccggtgc cgttgttttc cggagatgag atgatgaaag
 840
 gcgctggtgg tggtaggtggc accgccgta gtgccggtgg gtccggcggg tctcatcaga
 900
 ctggccggtt tgtttacgag gcaaaaacag cggaccaagt gaggttggat cttcatctgt
 960
 aataatttaa ttaattgaca aatttctaaa ttgacatgaa tttcctata gagatgatgg
 1020
 aaattttttc atcttctttt atatgcattt gcaaaagaga gaaaaaaaaa agaagagac
 1080
 aaaattccgg ccgctggaga cggatttaat aaaacactaa tcgatcaaat atttgtttct
 1140
 tc
 1142

<210> 8
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> An exemplary polypeptide sequence of a mutated MELO3C009603
 <400> 8

Met Asp Lys Ser Thr Ser Glu Arg Glu Thr His Asp Phe Met Asn Val
 1 5 10 15
 Glu Ser Phe Ser Gln Leu Pro Phe Ile Arg Pro Ala Pro Lys Glu Lys
 20 25 30
 Gly Ile Arg Leu Phe Gly Ile Glu Phe Gly Ser Arg Asn Ala Ala Thr
 35 40 45
 Val Ser Ala Ser Ser Ile Glu Glu Ser Glu Ser Gly Glu Thr Val Ile
 50 55 60
 Ala Cys Glu Asp Ala Lys Glu Asn Asn Asn Asp Gly Asn Asn Asn Asn
 65 70 75 80
 Gly Gly Glu Ser Ser Arg Arg Phe Glu Cys His Tyr Cys Cys Arg Asn
 85 90 95
 Ile Pro Thr Ser Gln Ala Leu Gly Gly His Gln Asn Ala His Lys Arg
 100 105 110
 Glu Arg Gln His Ala Lys Arg Ala His Leu Gln Ser Asn Ala Ala Ala
 115 120 125
 Met Val His Gly Ile Gly Pro Phe Ser Asp Ala Ala His Val Tyr Gly
 130 135 140
 Leu Met Asn Tyr Gln Arg Leu Gly Ala Thr His Leu Asn Asn Tyr Pro
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Arg Asn Ser Pro Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 165 170 175
 Thr Arg Phe Tyr Gly Ser Ser Gly Gly Gln Tyr Ser Ser Ala Ala Thr
 180 185 190
 Ala Thr Pro Ile Asn Gly Ser Pro Leu Ala Met Trp Arg Ile Ser Ala
 195 200 205
 Val Gln Asn Ser Asn Val Pro Ser Ser Phe Gly Gly Arg Glu Arg Ser
 210 215 220
 Ser Leu His Pro Leu Pro Leu Phe Ser Gly Asp Glu Met Met Lys Gly
 225 230 235 240
 Ala Gly Gly Gly Gly Gly Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

Ser His Gln Thr Gly Arg Phe Val Tyr Glu Ala Lys Thr Ala Asp Gln
 260 265 270

Val Ser Leu Asp Leu His Leu
 275

<210> 9
 <211> 1142
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> exemplary polynucleotide sequence of a mutated MELO3C009603

<400> 9
 tcttcctttt ctttcttctt ctttcttctt ttctgccgta accgattgat attaattctc
 60

tcctcgggtg cgcataggt ttttcaaac cccacggccc caacaccacc atatacactt
 120

tcattgacaa gattaccagt gaacgagaga ctcatgattt catgaacgtc gattctttct
 180

ctcaacttcc cttcatccgt cctgcaccaa aagaaaaggg cattaggctt ttcgggatag
 240

aatttgaag tcgaaacgct gctaccgtct ccgcttcttc cattgaggaa tcagagtcg
 300

gtgaaactgt tattgcatgc gaagatgcga aagaaaacaa caacgatggc aacaacaaca
 360

acggcggaga aagtagccgg agatttgaat gtcattactg ttgtagaaat atccctactt
 420

ctcaagcctt aggaggacac caaatgctc acaaaagaga ggcaccaat gcaaaaagg
 480

ctcaccttca gtctaacgca gccgctatgg ttcattggaat tggacccttt tcagatgcg
 540

ctcatgtcta tggcctcatg aactaccaac gcctaggcgc tactcacctt aataattacc
 600

cttcttggaa tagaaattcg ccagcagcaa cggctgctgc tgctgctgct acaagatttt
 660

acggtagctc tggtagggcag tattcgtcgg cagcaaccgc gacgcctata aacgggagcc
 720

cgttggcgat gtggagaatc tcggccgttc aaaatagtaa tgtaccgtca tcgtttggcg
 780

gtcgggagcg gtcgtctcta cacccgttgc cgttgttttc cggagatgag atgatgaaag
 840

gcgctgggtg tgggtgggtgc accgccgtta gtgccggtgg gtccggcggg tctcatcaga
 900

ctggccgggt tgtttacgag gcaaaaacag cggaccaagt gagtttggat cttcatctgt
960

aaataatttaa ttaattgaca aatttctaaa ttgacatgaa ttttctata gagatgatgg
1020

aaattttttc atcttctttt atatgcattt gcaaaagaga gaaaaaaaaa agaagagac
1080

aaaattccgg ccgctggaga cggatttaat aaaacactaa tcgatcaaat atttgtttct
1140

tc
1142

<210> 10
<211> 279
<212> PRT
<213> Cucumis melo

<400> 10

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

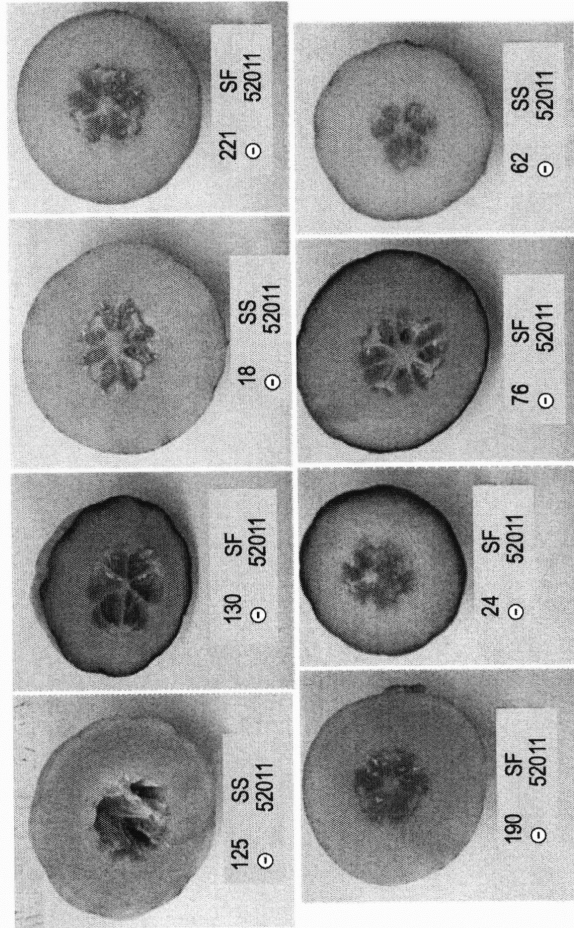
7

				165					170					175			
Thr	Arg	Phe	Tyr	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gln	Tyr	Ser	Ser	Ala	Ala	Thr		
			180					185					190				
Ala	Thr	Pro	Ile	Asn	Gly	Ser	Pro	Leu	Ala	Met	Trp	Arg	Ile	Ser	Ala		
		195					200					205					
Val	Gln	Asn	Ser	Asn	Val	Pro	Ser	Ser	Phe	Gly	Gly	Arg	Glu	Arg	Ser		
	210					215					220						
Ser	Leu	His	Pro	Leu	Pro	Leu	Phe	Ser	Gly	Asp	Glu	Met	Met	Lys	Gly		
225					230					235					240		
Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Ala	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly		
				245					250					255			
Ser	His	Gln	Thr	Gly	Arg	Phe	Val	Tyr	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Asp	Gln		
			260					265					270				
Val	Ser	Leu	Asp	Leu	His	Leu											
		275															

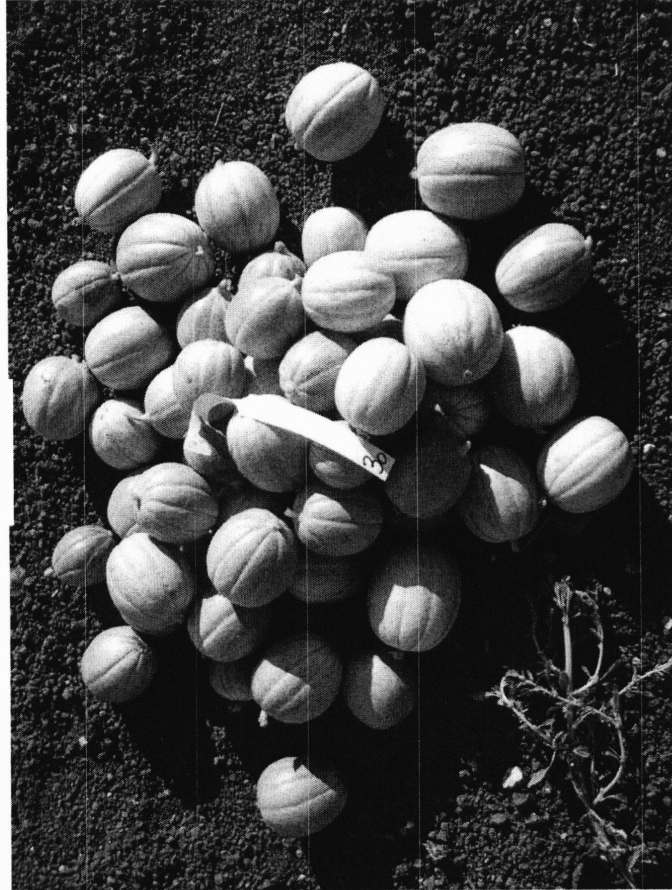
ФИГ. 1

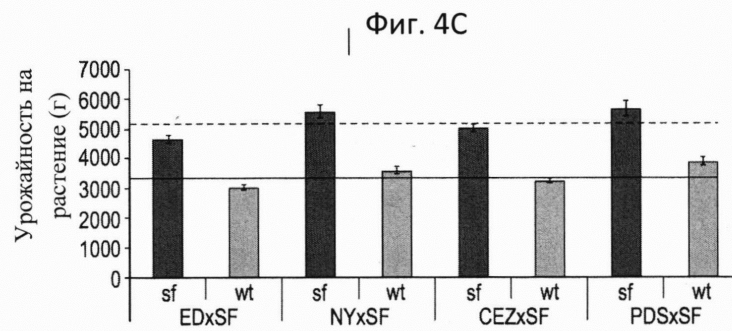
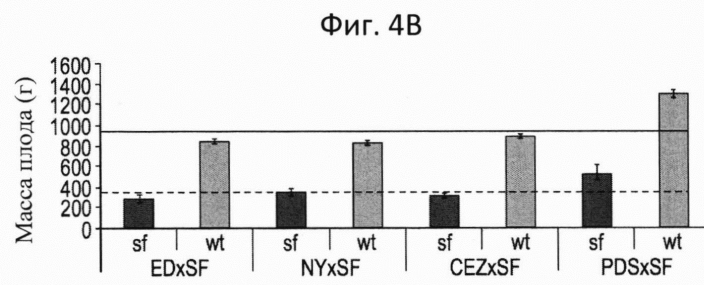
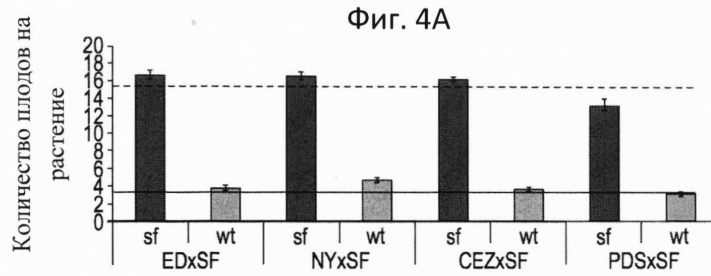


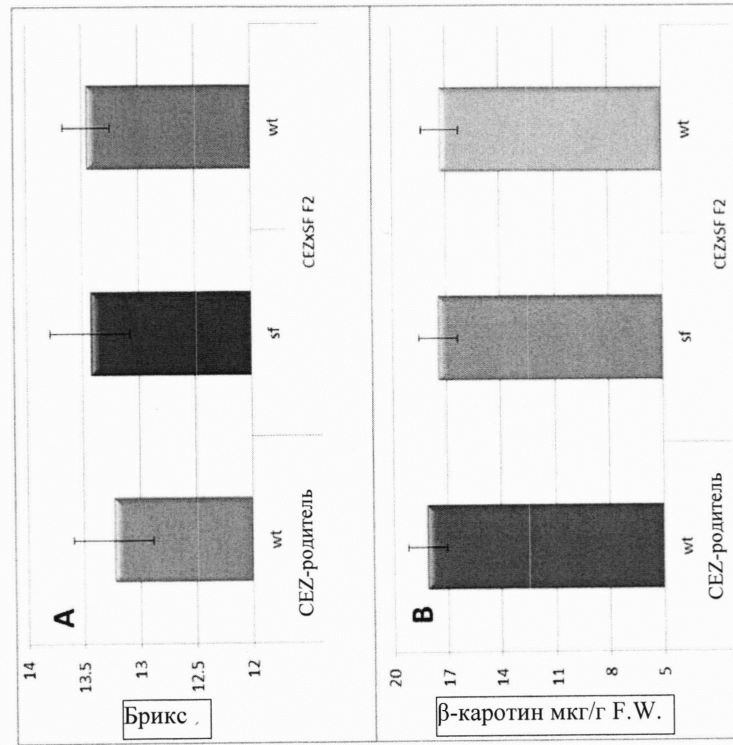
Фиг. 2

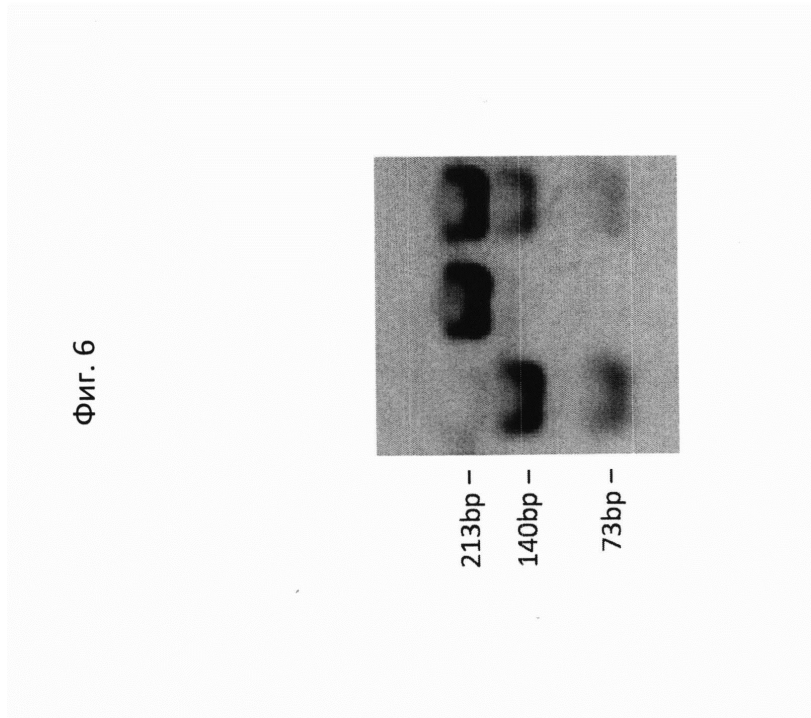


Фиг. 3





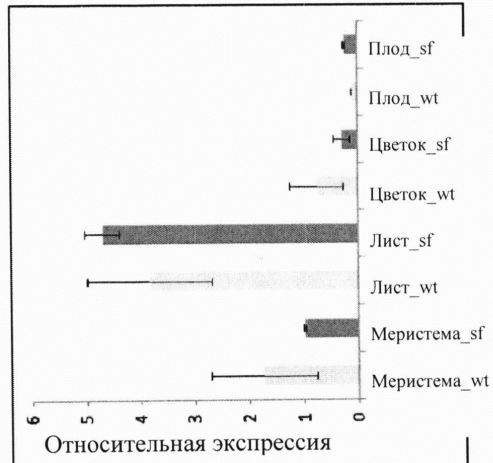




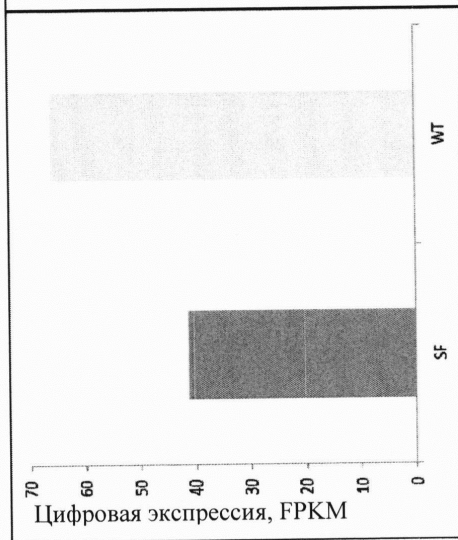
Фиг. 7

Дикий тип	CHYCCRNERTSQALGGHQNAH
'sf'	CHYCCRNERTSQALGGHQNAH

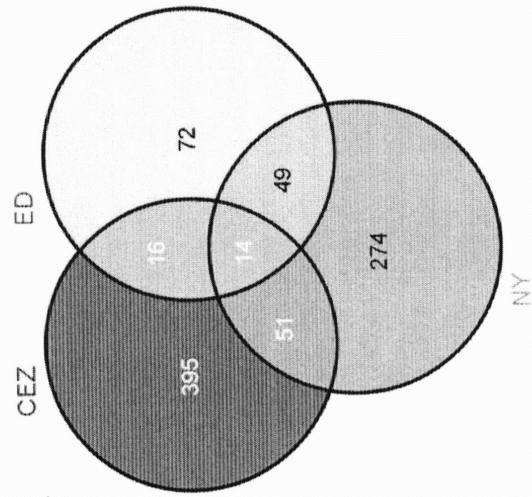
Фиг. 8В



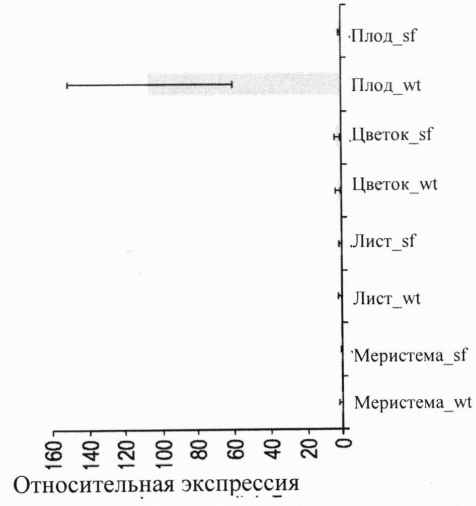
Фиг. 8А



Фиг. 9



Фиг. 10В



Фиг. 10А

