

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992503 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.10

(22) Дата подачи заявки
2018.04.19

(51) Int. Cl. *A01H 5/08* (2018.01)
A01H 1/04 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
A01H 6/34 (2018.01)
C12Q 1/6895 (2018.01)

(54) РАСТЕНИЯ ДЫНИ, УСТОЙЧИВЫЕ К ВИРУСУ ToLCNDV

(31) 17167580.4; 62/500,948

(32) 2017.04.21; 2017.05.03

(33) EP; US

(86) PCT/EP2018/060067

(87) WO 2018/193044 2018.10.25

(71) Заявитель:
НУНХЕМС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Лизарзабуру Чавес Хуан Антонио
(ES), Сконецка Джефри (US), Белон
Донья Даниель (ES)

(74) Представитель:

Беляева Е.Н. (BY)

(57) Настоящая заявка относится к растениям дыни, обладающим устойчивостью к ToLCNDV, содержащим один или два фрагмента интрогрессии в своем геноме.

A1

201992503

201992503

A1

Растения дыни, обладающие устойчивостью к ToLCNDV

Настоящая заявка относится к культурным растениям дыни (*Cucumis melo*), обладающим устойчивостью к заражению *вирусом курчавости листьев томата Нью-Дели* (ToLCNDV). Устойчивые растения дыни имеют геномный фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и/или на хромосоме 12. Фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 содержит локус количественных признаков (QTL), который придает устойчивость к ToLCNDV рецессивным образом. Фрагмент интрогрессии на хромосоме 12 содержит QTL, который придает устойчивость к ToLCNDV частично доминантным образом. В результате наличия обеих QTL получают культурные растения дыни, демонстрирующие слабые симптомы заболевания (средний индекс активности заболевания составляет, по меньшей мере, 8) или демонстрирующие отсутствие симптомов заболевания (средний индекс активности заболевания составляет 9). Также описаны маркеры для идентификации растений или частей растений, содержащих такие фрагменты интрогрессии, и способы идентификации и получения растений дыни, обладающих устойчивостью к ToLCNDV.

Вирус курчавости листьев томата Нью-Дели (ToLCNDV) классифицируется как вирус из рода *Begomovirus*, принадлежащий семейству *Geminiviridae*. ToLCNDV, имеет двухкомпонентный геном, состоящий из двух двухцепочечных молекул ДНК, которые именуются ДНК А и ДНК В (Saez et al., 2016, *Annals of Applied Biology*).

Изначально, в 1995 г., в Индии было обнаружено, что ToLCNDV инфицирует растения томата (*Solanum lycopersicum*). Затем было обнаружено, что ToLCNDV также инфицирует растения других растений рода *Solanacea*, таких как *Solanum melongena* (баклажан), перец чили (род *Capsicum*) и *Solanum tuberosum* (картофель). В 2012 г. в Испании были обнаружены инфицированные ToLCNDV растения бахчевых культур (кабачок, *Cucurbita pepo* сорт *giromontiina*), а в 2015 г. вирус был идентифицирован как источник заболевания в растениях дыни, огурца и кабачка в Тунисе. В то же время было доказано, что вирус инфицирует много растений рода *Cucurbitacea*, такие как *Benincasa hispida* (тыква восковая), *Citrullus lanatus* (арбуз), *Cucumis melo* (дыня), *Cucumis melo*, сорт *flexuosus* (дыня змеевидная), *Cucumis sativus* (огурец), *Cucurbita moschata* (тыква мускатная), *Cucurbita pepo* (тыква обыкновенная), *Cucurbita pepo*, сорт *giromontiina* (кабачок), *Lagenaria siceraria*

(горлянка обыкновенная), *Luffa cylindrica* (тыква мочалочная), *Momordica charantia* (тыква китайская горькая). Также были описаны случаи заражения сорных растений (например, *Eclipta prostrata* – семейство Asteraceae) и других культурных растений, таких как *Hibiscus cannabinus* (кенаф – семейство Malvaceae) и *Carica papaya* (папайя – семейство Caricaceae). В Средиземноморском регионе заболевание встречается у различных видов сельскохозяйственных культур в Италии (Сицилия), Испании и Тунисе. В азиатских странах инфекция была обнаружена в различных культурах в Бангладеш, Индии, Индонезии, Пакистане, Филиппинах, Шри-Ланке, Тайване и Таиланде. Дополнительная информация о географическом распространении ToLCNDV отсутствует, однако, исходя из текущих наблюдений, очевидно, что вирус далее распространяется и географически, и среди других культур.

Симптомы заболевания в целом включают фенотипическое появление желтой мозаики на листьях, скручивание листьев, набухание жилок и низкорослость растений. У бахчевых культур при заражении молодых растений ToLCNDV проявляется замедленный рост и уменьшение или снижение количества плодов. Также сообщалось о плодах с шероховатостью кожуры и продольным растрескиванием. Таким образом, ToLCNDV является причиной экономически значимых потерь урожая различных важных видов сельскохозяйственных культур и представляет собой серьезную угрозу. Заражение растений ToLCNDV происходит постоянно при передаче вируса белокрылкой, питающейся флоэмой. (*Bemisia tabaci*). (Европейская и Средиземноморская организация по защите растений (European and Mediterranean Plant Protection Organization), EPPO RS 2015/114, 2016/024, 2016/040, Дата ввода 2015-06).

Было показано, что у мочалочной тыквы устойчивость к ToLCNDV контролируется одним доминантным геном. (Islam et al., 2010, Euphytica 174(1):83-89).

Трансгенные растения томата, обладающие устойчивостью к ToLCNDV, были получены путем сайленсинга генов вируса. (Varma & Praveen, 2006, ISB News Report).

Были разработаны методы передачи ToLCNDV путем механического переноса сока зараженного растения цуккини неинфицированным растениям из других родов тыквенных растений (*Cucumis*, *Cucurbita*, *Citrullus*, *Lagenaria*). Были

идентифицированы пять изолятов *Cucumis melo* подвид *agrestis* (подвид *agrestis* сорт *momordica*: Mom-KhaInd/ Kharbuja, Mom-PI124Ind/ PI124112, Mom-PI124Ind/PI414723 и подвид *agrestis* дикие типы: Ag-WM9Ind/WM9, Ag-WM7Ind/WM7) обладающие устойчивостью к ToLCNDV (Lopez et al., 2015, Euphytica 204(3), 679-691). Подтверждение устойчивости этих образцов к природному заражению белокрылкой не проводили.

Saez et al. 2016, стр. 214-216 (Proceedings of Cucurbitaceae 2016, the XIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae July 24-28 2016, Варшава, Польша) описано, что отношение устойчивых: неустойчивых растений в популяции F2, полученной из образца WM-7 *C. melo* подвид *agrestis*, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, составляет 3:1, что указывает на наличие единственного доминантного гена устойчивости, присутствующего в WM-7. Как и в работе Lopez et al. 2015, *supra*, использовали механическую инокуляцию, а не природный путь инфицирования через белокрылку. В более поздней публикации (Saez et al., 14 July 2017, Plant Cell Report, DOI 10.1007/s00299-017-2175-3), производили картирование устойчивости из WM-7, и было обнаружено, что устойчивость придается доминантным QTL на хромосоме 11.

В документе WO2017/114848 описан QTL, придающий устойчивость к ToLCNDV, донорского растения *C. melo* подвид *agrestis* сорт *acidulous* (именуется H-MLCND-32), который при картировании локализуется в рецессивной хромосоме 11. Смесь двух линий, содержащих QTL (RIL-69 и RIL-82), была внесена в базу под номером доступа NCIMB 42506. Согласно Таблице 5 QTL должен находиться в подобласти между SEQ ID NO: 7 (Melon_sbg_33761_74) и SEQ ID NO: 16 (Melon_sbg_16835_17), так как RIL-30 имеет фенотип устойчивости, но не имеет донорных маркеров SNP для SEQ ID NO: 1 (Melon_sbg_617_42) – 6 (Melon_sbg_60684_74). Было обнаружено, что три SNP имеют наибольшую прогностическую ценность для фенотипа, а именно Melon_sbg_33761_74 (SEQ ID NO: 7), Melon_sbg_2720_78 (SEQ ID NO: 8) и Melon_sbg_14207_58 (SEQ ID NO: 9) (см. стр. 13, строки 29-30 и Фиг. 2). Описано, что уровни симптомов у донора варьируются, например, из 7 растений у 4 не было симптомов, у 2 были симптомы умеренного пожелтения, и у 1 растения присутствовали все симптомы (Таблица 1).

Осуществляли скрининг различных видов рода *Cucurbita* (*C. pepo*, *C. moschata*, *C. maxima*, *C. fraterna*, *C. ficifolia*) на устойчивость к ToLCNDV путем скринингового исследования механической передачи сока. Было обнаружено, что четыре образца *Cucurbita moschata* (PI 604506, PI 381814, Nigerian local, Kurokawa) проявляют сниженные симптомы после механического инфицирования ToLCNDV. При заражении белокрылкой этот результат, однако, может быть воспроизведен лишь для двух образцов (PI 604506, PI 381814), что показывает, что устойчивость к ToLCNDV следует тестировать не только в искусственных условиях, но и дополнительно используя природную систему инфицирования белокрылкой (Saez et al., 2016, Annals of Applied Biology). Таким образом, неясно, являются ли образцы, идентифицированные как устойчивые к инфекции ToLCNDV, устойчивыми в природных условиях выращивания, когда вирус переносится белокрылками.

Попытки борьбы с инфекцией сельскохозяйственных культур ToLCNDV включают борьбу с переносчиками (белокрылкой) с помощью инсектицидов и внедрение агротехнических приемов, включая использование безвирусного материала (пересадка растений), выделение площадей чистого пара и залежей, борьбу с сорняками (устранение зараженных вирусом сорняков) и уничтожение зараженных растений в полевых условиях. Однако из-за сложных эпидемиологических факторов, связанных с этим заболеванием, такие попытки не всегда являются эффективными (Saez et al., 2016, Annals of Applied Biology).

Следовательно, существует необходимость в реализации дальнейших мер, направленных на снижение заболеваемости ToLCNDV, предотвращения дальнейшего распространения вируса в другие географические районы и распространения на другие виды сельскохозяйственных культур. Для борьбы с этим заболеванием большое значение будет иметь выведение сортов, устойчивых к ToLCNDV.

Цель настоящего изобретения – предоставить меры контроля инфекции ToLCNDV у культурных растений дыни.

В соответствии с настоящим изобретением описаны культурные растения и клетки растений дыни, обладающие устойчивостью или обладающие высокой устойчивостью к инфекциям, вызываемым ToLCNDV.

Общеизвестно, что ToLCNDV заражает различные виды растений семейства *Cucurbitaceae*, в том числе различные виды дыни. Также хорошо известно, что ToLCNDV постоянно передается от зараженных растений к неинфицированным растениям через вредителей, питающихся этими растениями – *Bemisia tabaci* (белокрылка). Было показано, что возможен перенос ToLCNDV от одного вида сельскохозяйственных культур к другим видам сельскохозяйственных культур или даже от различных видов сорных растений к видам сельскохозяйственных культур. Белокрылка может переносить ToLCNDV из зон, где не предпринимаются меры по борьбе с этим заболеванием, от различных видов растений к растениям дыни, произрастающим в зоне, где предпринимаются меры по борьбе с этим заболеванием. Поэтому борьба с переносчиком (белокрылкой) имеет некоторую (однако ограниченную) эффективность в качестве меры предотвращения инфицирования ToLCNDV. Устойчивые к ToLCNDV растения дыни имеют то преимущество, что они не заражаются ToLCNDV, при этом не происходит значительных потерь урожая, даже если растения, произрастающие на прилежащих площадях, инфицированы ToLCNDV.

Авторами изобретения был идентифицирован донорский образец *C. melo* подвид *melo*, обладающий устойчивостью к ToLCNDV, полученный во Франции, но, согласно описанию, имеющий происхождение из западной Индии, и произвели картирование устойчивости в сегрегирующей популяции, путем инфицирования белокрылкой испанским штаммом ToLCNDV для фенотипирования устойчивости. Были идентифицированы два локуса количественных признаков (QTL), один на хромосоме 11 (QTL11) и один на хромосоме 12 (QTL12), и осуществляли их интрогрессию из донорского образца в элитную линию дыни Piel de Sapo и в элитную линию дыни Galia. Семена линии Piel de Sapo, включающие интрогрессии QTL11 и QTL12 в гомозиготной форме, были внесены в базу Nunhems B.V. 10.08.2016 г. под номером доступа NCIMB42625 в соответствии с Будапештским договором. В этих семенах присутствует донорский генотип маркеров однонуклеотидного полиморфизма (SNP) (SNP_01 – SNP_07), предоставляемый в соответствии с настоящим изобретением. Сам донор не однороден и имеет длинные (продолговатые) плоды малого диаметра с низким содержанием сухих веществ. Он также имеет и другие отрицательные характеристики, такие как очень слабое прикрепление плодоножки на стадии зрелости, очень короткий срок хранения

плодов и т.д., т.е. этот образец не имеет сельскохозяйственной ценности. Путем идентификации и переноса QTL11 и/или QTL12 от донора в культурную дыню стало возможным получать культурные сорта дыни и сорта с высокой агрономической ценностью (с единообразными характеристиками и с плодами, обладающими нормальным рыночным качеством, имеющими высокое содержание сухих веществ и высокую лежкоспособность), с устойчивостью к ToLCNDV; таким образом, можно выращивать эти сорта дыни в районах, зараженных ToLCNDV, без потери урожая.

В контексте настоящего изобретения термины «клетки растений дыни» или «растения дыни» или «культурные растения или клетки растений дыни», которые также могут именоваться в данной области «клетки растений мускусной дыни» или «растения мускусной дыни» означают клетки, полученные из растений вида *Cucumis melo*, или растения, принадлежащие к виду *Cucumis melo*. Вид *Cucumis melo* может подразделяться на следующие подвиды: *C. melo* сорт *cantalupensis*, *C. melo* сорт *inodorous* и *C. melo* сорт *reticulatus*. *C. melo* сорт *cantalupensis* также называют канталупой, в основном, она имеет круглую форму с выступающими ребрами и почти без сетчатости. Большинство плодов имеют сладкую мякоть оранжевого цвета, как правило, плоды имеют сильный, душистый запах. В отличие от европейской канталупы, североамериканская канталупа не относится к этому типу, однако она принадлежит к настоящим мускусным дыням. *C. melo* сорт *inodorous* (или зимние дыни) подразделяются на различные типы, такие как белая мускатная дыня, Пбель де сапо, сахарная дыня, японская дыня и т.д. *C. melo* сорт *reticulatus* – настоящая мускусная дыня с кожурой, покрытой сетчатым узором (сетчатая кожура), этот подвид включает дыни Галия, дыни Шарлин и североамериканскую канталупу.

Культурная дыня и ее дикие родственники являются диплоидными растениями и имеют 12 пар гомологичных хромосом, которые пронумерованы от 1 до 12.

В контексте настоящего изобретения термины «устойчивый» или «обладающий устойчивостью» относятся к растению, которое является видом-хозяином определенного патогена и, следовательно, может быть заражено данным патогеном, однако при этом растение содержит генетический элемент (например, фрагмент интрогрессии), приводящий к снижению развития и/или распространения патогена в растении после заражения по сравнению с растением, восприимчивым к такому патогену, в котором такой генетический элемент отсутствует. В контексте

настоящего изобретения термины «устойчивый» или «обладающий устойчивостью», в частности, относятся к растениям или клеткам растений, устойчивым к ToLCNDV. Устойчивость – это относительный термин, который может охватывать целый ряд (различных) реакций, вызванных патогенной инфекцией, в растении или клетке растения. Эффект этих реакций в растении или клетке растения может быть измерен различными способами. Как правило, эффект измеряется путем определения уровня симптомов, проявляющихся в растении или клетке растения. Как правило, среднюю степень выраженности симптомов (средний индекс активности заболевания) в нескольких растениях в линии (например, в 10 растениях и более) сравнивают со средней степенью выраженности симптомов (средний индекс активности заболевания) в растениях контрольной линии или сорта, предпочтительно в растениях контрольной линии или сорта, восприимчивых к такому патогену. Таким образом, в определенный момент времени производится оценка и подсчет баллов, по меньшей мере, для 10 и более отдельных растений линии или сорта и вычисляется средний индекс активности заболевания. В контексте настоящего изобретения, в соответствии с фенотипическими наблюдениями, проведенными после инфицирования ToLCNDV, применяют следующие общеизвестные уровни выраженности симптомов (или индексы активности заболевания):

1 = Мертвое растение

2 = Чрезвычайно сильная мозаичность и свертывание листа, хлороз и снижение роста. Растение не может выздороветь

3 = Сильная мозаичность и свертывание листа, хлороз и снижение роста. Растение не может выздороветь

4 = Свертывание и мозаичность, хлороз, наблюдается незначительное снижение роста, или снижение роста не наблюдается. Растение не может выздороветь

5 = Свертывание и мозаичность, хлороз, снижение роста не наблюдается. Наблюдается незначительное выздоровление верхней части растения

6 = Незначительное свертывание, мозаичность и хлороз, снижение роста не наблюдается. Наблюдается выздоровление верхней и средней части растения

7 = Незначительное свертывание, мозаичность и хлороз, снижение роста не

наблюдается. Симптомы наблюдаются лишь в нижней части растения

8 = Слабая мозаичность

9 = Симптомы отсутствуют

Для определения уровня выраженности симптомов (или индекса активности заболевания) предпочтительно молодые растения заражают ToLCNDV. Такими молодыми растениями предпочтительно являются растения возраста увеличения первого истинного листа, предпочтительно приблизительно возраста 12 - 15 дней после посева. Заражение предпочтительно осуществляется через переносчика вируса (*Bemisia*), который поедает растения. Для этого проращивание и выращивание растений осуществляется в оптимальных условиях или в условиях близких к оптимальным. Уровень выраженности симптомов предпочтительно определяется, по меньшей мере, один раз, например, через 30 дней после инфицирования (или позже, например, через 31, 32, 33, 34, 35 дней после инфицирования). При необходимости, для подтверждения результата уровень выраженности симптомов определяют дважды или даже трижды в разные моменты времени после заражения, например, первую оценку производят приблизительно через 15, 20 или 25 дней после заражения ToLCNDV, а вторую оценку – приблизительно через 30 дней после заражения (или позднее, например, через 31, 32, 33, 34, 35 дней после заражения). См. также раздел «Примеры». Средний индекс активности заболевания рассчитывается для каждой линии или сорта в каждой временной точке. В соответствии с одним аспектом растительная линия или сорт именуются устойчивыми к инфицированию ToLCNDV, если для них средний индекс активности заболевания 7,0 или выше, в то время как восприимчивая контрольная линия или сорт, например, сорт Gandalf или Vedantrais имеет средний индекс активности заболевания 4,0 или менее, 3,0 или менее или 2,0 или менее при выращивании в тех же условиях и инфицировании таким же образом. В соответствии с еще одним аспектом растительная линия или сорт именуются высокоустойчивыми к инфицированию ToLCNDV, если для них средний индекс активности заболевания 8,0 или выше, предпочтительно средний индекс активности заболевания составляет 9,0 в то время как восприимчивая контрольная линия или сорт, например, сорт Gandalf (или Gandalf F1, Nunhems B.V.) или Vedantrais имеет средний индекс активности заболевания 4,0 или менее, 3,0 или менее или 2,0 или менее при выращивании в тех же условиях и инфицировании таким же образом.

Наблюдалось, что интрогрессия специфических фрагментов, расположенных на хромосоме 11 (содержащих QTL11) и 12 (содержащих QTL12) из того же дикого растения дыни, в культурные растения дыни придает устойчивость к инфекции ToLCNDV культурным растениями дыни или полученным из них клеткам. При том что фрагмент на хромосоме 11 должен присутствовать в гомозиготной форме для придания устойчивости, для придания устойчивости к ToLCNDV достаточно, чтобы фрагмент на хромосоме 12 присутствовал только в гетерозиготном состоянии, это показывает, что фрагмент на хромосоме 11 придает устойчивость рецессивным образом, а фрагмент на хромосоме 12 придает устойчивость к ToLCNDV частично доминантным образом. Были идентифицированы единичные нуклеотидные полиморфизмы (SNP) на хромосоме 11 и 12, которые тесно связаны с фрагментом хромосомы 11 и 12, обеспечивающим устойчивость к ToLCNDV. Во внесенных в базу семян генотип SNP устойчивого донора (то есть нуклеотид фрагмента интрогрессии) присутствует в гомозиготной форме, то есть донорный генотип присутствует в гомозиготной форме для SNP_01–SNP_04 (связан с QTL11), а также для SNP_05–SNP_07 (связан с QTL12). Следовательно, SNP можно использовать для тестирования присутствия фрагмента интрогрессии, содержащего QTL11 или QTL12, в клетке, ткани, части растения и/или в селекции с помощью маркера (СПМ) для переноса QTL в другие элитные линии или сорта дыни. SNP также можно использовать для селекции растений, содержащих меньшие фрагменты интрогрессии, по сравнению с фрагментами, присутствующими во внесенных в базу семенах, при этом такие меньшие субфрагменты все равно содержат QTL. В качестве альтернативы, SNP можно использовать для идентификации других доноров, которые включают QTL11 и/или QTL12, и для введения этих QTL в культурную дыню.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к культурным растениям или клеткам (или частям) растения дыни, которые содержат фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 и/или 12 устойчивого к ToLCNDV донорского растения, при этом указанный фрагмент интрогрессии содержит последовательность донорского растения между SNP_01 и SNP_04 для фрагмента на хромосоме 11, предпочтительно между SNP_02 и SNP_04 для фрагмента на хромосоме 11 или при необходимости, между SNP_03 и SNP_04; или при необходимости, между SNP_01 и SNP_03 или между SNP_02 и SNP_03 или между SNP_01 и SNP_02; и/или между SNP_05 и SNP_07 для фрагмента на

хромосоме 12, при необходимости, между SNP_05 и SNP_06 или между SNP_06 и SNP_07. QTL, придающий устойчивость к ToLCNDV, присутствует на фрагменте интрогрессии, что может быть определено с помощью анализа устойчивости в соответствии с описанием в настоящем документе.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к культурным растениям (или частям растений) или клеткам растений дыни, содержащим фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 и/или 12 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, и фрагмент интрогрессии может быть идентифицирован по генотипу SNP растения-донора (содержит генотип SNP растения-донора) для одного или более (или для всех) следующих SNP: SNP_01, SNP_02, SNP_03 и/или SNP_04, и, при необходимости, любого SNP между SNP_01 и SNP_04 для фрагмента на хромосоме 11; и/или при этом фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, и фрагмент интрогрессии может быть идентифицирован по генотипу SNP растения-донора (содержит генотип SNP растения-донора) для одного или более (или для всех) следующих SNP: SNP_05, SNP_06 и/или SNP_07 и, при необходимости, любого SNP между SNP_05 и SNP_07 для фрагмента на хромосоме 12. QTL, придающий устойчивость к ToLCNDV, присутствует на фрагменте интрогрессии, что может быть определено с помощью анализа устойчивости в соответствии с описанием в настоящем документе.

В соответствии с одним аспектом генотип SNP для SNP_01, SNP_02, SNP_03 и/или SNP_04 представляет собой генотип SNP донора интрогрессии QTL11, т.е. аденин (A) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 1 (SNP_01), гуанин (G) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 2 (SNP_02), тимин (T) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 3 (SNP_03), тимин (T) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 4 (SNP_04).

В соответствии с одним аспектом растение, часть или клетка растения содержат QTL11 и содержат донорский генотип SNP, по меньшей мере, для SNP_03, так как этот SNP наиболее сильно связан с устойчивостью QTL11 к ToLCNDV. В соответствии с еще одним аспектом растение, часть или клетка растения содержат донорский генотип SNP, по меньшей мере, для SNP_03 и SNP_04, или, по меньшей мере, для SNP_03 и SNP_02. При необходимости, растение, часть или клетка растения содержат QTL11 и содержат донорский генотип SNP, по меньшей мере, для SNP_01, SNP_02 и SNP_03; или для SNP_02, SNP_03 и SNP_04. В соответствии с

одним аспектом растение, часть или клетка растения содержат QTL11 и содержат донорский генотип SNP для всех четырех SNP (SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04).

В соответствии с одним аспектом генотип SNP для SNP_05, SNP_06 и/или SNP_07 представляет собой генотип SNP донора интрогрессии QTL12, т.е. цитозин (C) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 5 (SNP_05) и/или гуанин (G) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 6 (SNP_06) и, при необходимости, тимин (T) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 7 (SNP_07). В соответствии с одним аспектом растение, часть или клетка растения содержат QTL12 и содержат донорский генотип SNP, по меньшей мере, для SNP_06, так как этот SNP наиболее сильно связан с устойчивостью QTL12 к ToLCNDV. В соответствии с еще одним аспектом растение, часть или клетка растения содержат донорский генотип SNP, по меньшей мере, для SNP_05 и SNP_06, или, по меньшей мере, для SNP_06 и SNP_07. При необходимости, растение, часть или клетка растения содержат QTL12 и содержат донорский генотип SNP для SNP_05 и SNP_06 и, при необходимости, также для SNP_07.

В соответствии с одним аспектом выражение «фрагмент интрогрессии, содержащий донорскую хромосомную последовательность или донорскую последовательность (и QTL) между двумя SNP (однонуклеотидными полиморфизмами)» означает, что один или оба из двух SNP также происходят от донора, обладающего устойчивостью» т.е. имеют донорный нуклеотид. Таким образом, в отношении QTL на хромосоме 11, SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04 все могут иметь генотип устойчивого донора. Или лишь SNP_01 и SNP_02 могут иметь генотип устойчивого донора; или только SNP_02 и SNP_03 могут иметь генотип устойчивого донора; или только SNP_03 и SNP_04 могут иметь генотип устойчивого донора. Или лишь один SNP, т.е. лишь SNP_01 или лишь SNP_02 или лишь SNP_03 или лишь SNP_04 имеет генотип устойчивого донора. Таким образом, SNP, которые не имеют генотип устойчивого донора, имеют другой генотип, генотип реципиента. Генотип реципиента для SNP может быть любым из 3 других нуклеотидов, то есть для SNP_01 генотип реципиента может быть цитозином, гуанином или тимином.

Таким образом, например, когда указано, что фрагмент интрогрессии расположен между SNP_05 и SNP_06 в отношении QTL на хромосоме 12, SNP_05 и SNP_06 могут иметь генотип устойчивого донора. Или лишь один SNP, т.е. лишь SNP_05 или лишь SNP_06 могут иметь генотип устойчивого донора. При необходимости, также SNP_07 может иметь генотип устойчивого донора.

Причина того, что не все SNP в соответствии с настоящим изобретением должны иметь генотип устойчивого донора, состоит в том, что фрагмент интрогрессии, содержащий QTL из донора, может быть меньше, чем фрагмент хромосомы, интрогрессированный, например, во внесенные в базу семена, но это фрагмент все равно содержит QTL11 или QTL12. Тем не менее, можно определить, что растение содержит фрагмент интрогрессии (содержащий QTL11 или QTL12) по фенотипу и/или путем переноса фрагмента в восприимчивое растение и, следовательно, переноса фенотипа устойчивости к ToLCNDV или путем секвенирования участка между SNP маркерами для идентификации донорного фрагмента или с помощью других способов, известных специалистам, таких как насыщение области большим количеством маркеров SNP, исследования на аллелизм, идентификация причинного гена и т.д.

Таким образом, для демонстрации того, что QTL11 или QTL12 присутствует в растении или клетке растения может быть использована комбинация методов, даже если не для всех связанных SNP присутствует донорный генотип SNP. Средний индекс устойчивости к ToLCNDV, который придается QTL11, составляет, по меньшей мере, 7,0 при переносе в линию или сорт, которые не обладают устойчивостью, при условии, что этот признак является рецессивным. Средний индекс устойчивости к ToLCNDV, который придается QTL12, составляет, по меньшей мере, 5,0 или 6,0 при переносе в линию или сорт, которые не обладают устойчивостью, при условии, что этот признак является доминантным. Когда в культурном растении объединяются оба QTL, чтобы их фенотип был выражен, получают средний индекс устойчивости к ToLCNDV, по меньшей мере, 8,0 или, по меньшей мере, 9,0.

Когда QTL12 переносится в растение дыни, которые уже обладают некоторым уровнем устойчивости к ToLCNDV, он увеличивает средний уровень устойчивости на 1 или 2 балла, таким образом, например, если у растения-реципиента средний уровень сопротивления составляет 7,0, в результате введения QTL12 уровень устойчивости повысится, по меньшей мере, до 8,0 или 9,0.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом генотип SNP растения дыни, содержащего фрагмент интрогрессии на хромосоме 11, является генотипом устойчивого донора, т.е. в одном аспекте, по меньшей мере, один, при необходимости, по меньшей мере, два, при необходимости, три или, при

необходимости, все четыре из следующих SNP на хромосоме 11 имеет/имеют генотип устойчивого донора, как указано в Таблице 1 ниже. Поскольку, чтобы придать фенотип устойчивости к ToLCNDV фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 должен быть в гомозиготной форме, генотип SNP указывается в гомозиготной форме.

В соответствии с еще одним аспектом генотип SNP растения дыни, содержащего фрагмент интрогрессии на хромосоме 12, является генотипом устойчивого донора, т.е. в одном аспекте, по меньшей мере, один, при необходимости, по меньшей мере, два из SNP на хромосоме 12, выбранных из SNP_05, SNP_06 и SNP_07, имеет/имеют генотип устойчивого донора, как указано в Таблице 1 ниже. При необходимости, все три SNP имеют генотип устойчивого донора, как указано в Таблице 1 ниже. Несмотря на то, что фрагмент интрогрессии на хромосоме 12 не обязательно должен быть в гомозиготной форме, чтобы придать фенотип устойчивости к ToLCNDV, гомозиготная форма является предпочтительной. Таким образом, генотип SNP указан в гомозиготной форме

Отмечается, что SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04 физически расположены на хромосоме 11 в этом порядке, а SNP_05, SNP_06 и SNP_07 — на хромосоме 12. Следовательно, фрагмент интрогрессии может содержать донорный генотип SNP для всех четырех маркеров SNP, связанных с QTL11 и/или для всех трех маркеров SNP, связанных с QTL12 (как в семенах, внесенных в базу в соответствии с настоящим изобретением), или фрагмент меньшего размера, в результате чего один или более маркеров SNP отсутствуют. Как описано ниже, могут отсутствовать все донорные маркеры SNP или все донорные маркеры SNP за исключением одного, при этом QTL11 или QTL12 будет все же присутствовать на фрагменте интрогрессии.

Таблица 1:

SNP (однонуклеотидный полиморфизм)	Устойчивый донорский генотип SNP в гомозиготной форме	QTL на хромосоме
SNP_01 касается нуклеотида 101 SEQ ID NO:1 (или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%, или, по	AA	11

меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1)		
SNP_02 касается нуклеотида 101 SEQ ID NO:2 (или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2)	GG	11
SNP_03 касается нуклеотида 101 SEQ ID NO:3 (или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3)	TT	11
SNP_04 касается нуклеотида 101 SEQ ID NO:4 (или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4)	TT	11
SNP_05 касается нуклеотида 101 SEQ ID NO:5 (или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5)	CC	12
SNP_06 касается нуклеотида 101 SEQ ID NO:6 (или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6)	GG	12
SNP_07 касается нуклеотида 101 SEQ ID NO:7 (или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7)	TT	12

Нуклеотидные последовательности (SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 7), содержащие SNP согласно настоящему изобретению, представляют собой нуклеотидные последовательности устойчивого донора, то есть они содержат донорный нуклеотид SNP. Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к культурным клеткам растений дыни или

растениям дыни (или частям растения), содержащим фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 и/или 12 из устойчивого к ToLCNDV донорского растения, при этом такой фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, и такой фрагмент интрогрессии может быть идентифицирован по (содержит) SEQ ID NO: 1 или по аденину на нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 1 или по аденину на эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность с SEQ ID NO: 1, и/или по SEQ ID NO: 2 или гуанину в нуклеотиде 101 SEQ ID NO:2 или по гуанин в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность с SEQ ID NO: 2, и/или по SEQ ID NO: 3 или по тимину в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 3 или по тимину в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность с SEQ ID NO: 3, и/или по SEQ ID NO: 4, или тимину в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 4, или по тимину в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность с SEQ ID NO: 4, для фрагмента на хромосоме 11; и/или при этом фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV и может быть идентифицирован по (содержит) SEQ ID NO: 5, или по цитозину в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 5 или по цитозину в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность с SEQ ID NO:5, и/или по SEQ ID NO: 6, или по гуанину в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 6, или по гуанину в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность с SEQ ID NO: 6, и/или по SEQ ID NO: 7 или по тимину в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 7, или по тимину в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность с SEQ ID NO: 7 для фрагмента на хромосоме 12. QTL, придающий устойчивость к ToLCNDV, присутствует на фрагменте интрогрессии.

В соответствии с одним аспектом в культурную дыню вводят только QTL на хромосоме 11 или только QTL на хромосоме 12. QTL на хромосоме 11 оказывает большее влияния на устойчивость к ToLCNDV (при условии, что он присутствует в гомозиготной форме) по сравнению с QTL на хромосоме 12. Средний индекс устойчивости культурной дыни к ToLCNDV, который придается QTL на хромосоме 11, составляет, по меньшей мере, 7,0 по сравнению со средним индексом устойчивости 4,0 или менее или 3,0 или менее для контрольной линии или сорта без QTL, например, для сорта, который не обладает устойчивостью к ToLCNDV.

С другой стороны, QTL на хромосоме 12, когда он находится в гетерозиготной форме, также придает устойчивость к ToLCNDV. Средний индекс устойчивости культурной дыни к ToLCNDV, который придается QTL на хромосоме 12, составляет, по меньшей мере, 5,0 или, по меньшей мере, 6,0 по сравнению с индексом устойчивости 4,0 или менее или 3,0 или менее для контрольной линии или сорта без QTL, например, для сорта, который не обладает устойчивостью к ToLCNDV.

В соответствии с другим аспектом в культурную дыню вводятся оба QTL, QTL на хромосоме 11 и QTL на хромосоме 12. В одном аспекте, по меньшей мере, QTL на хромосоме 11 присутствует в гомозиготной форме. В соответствии с другим аспектом оба QTL присутствуют в гомозиготной форме. В случае присутствия обоих QTL, когда оба QTL присутствуют в гомозиготной форме, обеспечивается наивысший средний индекс устойчивости, по меньшей мере, 8,0, предпочтительно 9,0 (симптомы отсутствуют).

Донор имеет средний индекс активности заболевания 9,0 (симптомы отсутствуют). Очевидно, что другие доноры со средним индексом 9,0 также могут содержать QTL11 и/или QTL12. Маркер SNP, предоставляемый в соответствии с настоящим документом, может использоваться для скрининга такого донора на присутствие QTL 11 и QTL12.

В соответствии с другим аспектом один или более SNP или все SNP или все SNP, кроме одного SNP, связанные с QTL, могут происходить от реципиента, например, от растения дыни, не обладающего устойчивостью, и лишь участок между двумя SNP происходит из устойчивого донора и придает устойчивость к ToLCNDV, т.е. донорный фрагмент, придающий устойчивость, расположен между двух маркеров SNP. Например, растение может содержать фрагмент интрогрессии, содержащий последовательность устойчивого к ToLCNDV растения-донора дыни (несущую QTL11) между SNP_03 и SNP_04, в соответствии с одним аспектом это растение содержит цитозин (C) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 3 и цитозин (C) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 4, т.е. реципиентные, а не донорные нуклеотиды. Таким образом, в соответствии с другим аспектом лишь участок (весь участок или его часть) между этими двумя SNP происходит из донора, в то время как SNP_03 и SNP_04 происходят из реципиента с цитозином (C) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 3 и цитозином (C) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 4. То же самое справедливо для других пар SNP.

В соответствии с одним аспектом, по меньшей мере, SNP_04 в культурном растении дыни, части или клетке растения дыни по изобретению происходит от устойчивого донора и имеет донорный генотип, т.е. фрагмент интрогрессии содержит QTL11 и SEQ ID NO: 4.

В соответствии с еще одним аспектом, по меньшей мере, SNP_06 в культурном растении дыни, части или клетке растения дыни по изобретению происходит от устойчивого донора и имеет донорный генотип, т.е. фрагмент интрогрессии содержит QTL12 и SEQ ID NO: 6.

В предпочтительном варианте реализации изобретения фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 растения-донора, содержащего последовательность растения-донора (содержащую QTL11) между SNP_01 и SNP_04 или между SNP_01 и SNP_03 или между SNP_01 и SNP_02 или между SNP_02 и SNP_04 или между SNP_02 и SNP_03 или между SNP_03 и SNP_04, или предпочтительно между SNP_02 и SNP_04 придает устойчивость к ToLCNDV растениям или клеткам растений дыни по настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте реализации изобретения фрагмент интрогрессии из хромосомы 12 растения-донора, содержащего последовательность растения-донора (содержащую QTL12) между SNP_05 и SNP_07 или между SNP_05 и SNP_06 или между SNP_06 и SNP_07 придает устойчивость к ToLCNDV растениям или клеткам растений дыни по настоящему изобретению.

Предпочтительно, клетка растения дыни по настоящему изобретению получена из культурного растения дыни, или растение дыни по настоящему изобретению представляет собой культурное растение дыни.

В контексте настоящего изобретения выражение «клетка растения донора» или «растение-донор» означает клетку дыни или растение дыни, которые обладают устойчивостью к ToLCNDV, предпочтительно со средним индексом устойчивости, по меньшей мере, 9,0. Аналогичным образом, термин «фрагмент ДНК или фрагмент интрогрессии из растения-донора или клетки растения-донора» означает фрагмент хромосомы 11 или 12 растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, в результате чего этот фрагмент придает устойчивость к ToLCNDV при переносе в растение дыни, не обладающее устойчивостью к ToLCNDV. В одном варианте осуществления настоящего изобретения растение-донор представляет собой дикий

вид или дикий образец дыни. В соответствии с одним вариантом реализации изобретения фрагменты ДНК или фрагменты интрогрессии из растений-доноров или клеток растений-доноров представляют собой донорные фрагменты, которые получены или могут быть получены из растений или присутствуют в растениях, которые выращены из семян, внесенных в базу под № NCIMB 42625, или из потомства, полученного из растений, выращенных из семян, внесенных в базу под № NCIMB 42625, или из растений, полученных путем скрещивания с растениями, выращенными из семян, внесенных в базу под № NCIMB 42625. Как было указано, внесенные в базу семена представляют собой семена культурной дыни (Piel de Sapo), в которую были введены QTL11 и QTL12 от донорского растения, средний индекс активности заболевания которого составляет 9,0.

Растения-доноры дыни могут быть получены из различных источников. Специалистам известны способы определения того, из каких источников были получены растения-доноры дыни, обладающие устойчивостью к ToLCNDV. Для определения таких источников растений-доноров, обладающих устойчивостью к ToLCNDV, в основном, растения дыни могут быть инфицированы ToLCNDV, механическим путем в соответствии с описанием в работе Lopez et al. (2015, *Euphytica* 204(3), 679-691) или путем передачи вируса от белокрылки. В контексте настоящего изобретения предпочтительно инфицирование происходит через белокрылку. Затем могут быть выбраны растения, проявляющие пониженные уровни выраженности симптомов по сравнению с контрольными растениями, не обладающими устойчивостью, и такие растения могут использоваться в качестве источника фрагментов генома или последовательностей, придающих устойчивость к ToLCNDV. Предпочтительный способ заражения растений дыни ToLCNDV и способы определения уровня выраженности симптомов зараженных растений приведены в настоящем документе в разделе «Общие методы».

В контексте настоящего изобретения растения-доноры предпочтительно имеют средний уровень выраженности симптомов равный или выше 8,0, наиболее предпочтительно равный или выше 9,0. В одном аспекте донорское растение содержит такой же генотип SNP, как показан в Таблице 3 для донора для SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04. В одном аспекте донорское растение содержит такой же генотип SNP, как показан в Таблице 3 для донора для SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04 и для SNP_05, SNP_06, и, при необходимости, также для SNP_07.

Предпочтительно донорный генотип SNP является гомозиготным.

В соответствии с настоящим изобретением термины «рекуррентная растительная клетка» или «рекуррентное растение» или «растение-реципиент» означают растение или клетку растения дыни, которое является чувствительным (синоним – «восприимчивым») или которое не обладает устойчивостью к инфекции ToLCNDV. Является ли растение чувствительным или обладает ли оно устойчивостью к ToLCNDV, можно определить, наблюдая уровни выраженности симптомов после инфицирования ToLCNDV. Рекуррентное растение предпочтительно имеет средний уровень выраженности симптомов равный или ниже 4,0, равный или ниже 3,0, более предпочтительно равный или ниже 2,0. Уровни выраженности симптомов и способы заражения растений дыни ToLCNDV описаны по тексту настоящего документа и применяют здесь соответственно. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения клетка рекуррентного растения дыни по настоящему изобретению происходит из культурного растения дыни, или рекуррентное растение дыни по настоящему изобретению представляет собой культурное растение дыни. Предпочтительно это элитная линия, линия разведения или сорт.

Термин «фрагмент интрогрессии» относится к фрагменту хромосомы, части или участку хромосомы, который был введен в другое растение того же или родственного вида путем скрещивания или традиционными методами селекции. В результате интрогрессии фрагмента из растения-донора в рекуррентное растение потомство, полученное в результате скрещивания растения-донора и рекуррентного растения, приобретает фенотип, отсутствующий в рекуррентном растении. В контексте настоящего изобретения фенотип, перенесенный из растения-донора в рекуррентное растение, является устойчивостью к ToLCNDV, в частности, средний индекс активности заболевания в таком растении составляет 7,0 или более, 8,0 или более или 9,0 или более. Для интрогрессии фрагмента в определенную элитную линию или сорт первый этап скрещивания может, например, сопровождаться одним или несколькими обратными скрещиваниями с предполагаемой линией разведения или сортом. При использовании по тексту настоящего документа термин «интрогрессия» может относиться к скрещиванию растения-донора, устойчивого к ToLCNDV, с рекуррентным растением, не обладающим устойчивостью к ToLCNDV, и дальнейшему обратному скрещиванию одного или более растений, устойчивых к

ToLCNDV, полученных в результате скрещивания, с растениями-реципиентами, которые должны приобрести устойчивость к ToLCNDV. В таком случае интрогрессированный фрагмент является результатом применения методов размножения, для которых используется термин «интрогрессия» (таких как обратное скрещивание), в отношении реципиентного сорта или линии размножения, или элитной линии. Таким образом, интрогрессия признака устойчивости к ToLCNDV в рекуррентное растение – это технический антропогенный процесс. В частности, в настоящем документе термин «интрогрессия» относится к процессу или способу искусственного разведения. В таком процессе могут использоваться один или более или все молекулярные маркеры в соответствии с настоящим изобретением. Полученное растение, т.е. культурная линия или сорт, которые содержат один или два фрагмента интрогрессии от донора, также являются искусственным и не существуют в природных условиях.

Фрагмент интрогрессии может быть большим, например, он может составлять половину хромосомы, однако предпочтительно он меньше, например, около 15 Мб (мегабаз) или менее, например, около 10 Мб или менее, около 9 Мб или менее, около 8 Мб или менее, около 7 Мб или менее, около 6 Мб или менее, около 5 Мб или менее, около 4 Мб или менее, около 3,5 или 3 Мб или менее, около 2 Мб или менее, около 1 Мб (что равно 1 000 000 оснований или менее) или около 0,9 Мб (что равно 900 000 пар оснований) или менее, например, 0,8 Мб, 0,7 Мб, 0,6 Мб, 0,5 Мб, 0,4 Мб, 0,3 Мб или менее.

Физическое расстояние между SNP_01 и SNP_04 составляет приблизительно 1,16 Мб, а физическое расстояние между SNP_05 и SNP_06 составляет приблизительно 0,88 Мб, а между SNP_05 и SNP_07 – приблизительно 3,4 Мб. Таким образом, в соответствии с одним аспектом фрагмент интрогрессии содержит физическую область, указанную по тексту настоящего документа, содержащую один или более из SNP или их подобласть, которая сохраняет QTL.

Фрагмент интрогрессии может происходить, например, из дикого растения дыни или дикого образца дыни, или диких родственников дыни или местных сортов (донор). Дикие растения дыни или образцы дикой дыни, или дикие родственники растений или местные сорта дыни могут использоваться для интрогрессии фрагментов донорного генома в геном культурной дыни *Cucumis melo* для создания элитных линий или сортов с хорошими агрономическими характеристиками. Таким

образом, такое культурное растение дыни имеет «геном культурного растения *C. melo*», однако содержит в своем геноме фрагмент донора, например, фрагмент интрогрессии родственного генома *Cucumis* genome, например, *Cucumis melo* ssp. *agrestis*, *C. melo* ssp. *melo*, *C. melo* ssp. *acidulous*, *C. callosus*, *C. trigonus*, *C. picrocarpus* или другой дикой дыни или дикого родственника дыни. Очевидно, что термин «фрагмент интрогрессии» никогда не включает в себя целую хромосому, а только часть хромосомы. Следовательно, хромосомы, несущие интрогрессию, также включают часть или части рекуррентного растения дыни (растения-реципиента) и, кроме того, части растения-донора дыни.

В соответствии с одним аспектом растение-донор по изобретению не является растением из пяти образцов *Cucumis melo* подвид *agrestis* accessions (подвид *agrestis* сорт *momordica*: Mom-KhaInd/ Kharbuja, Mom-PI124Ind/ PI124112, Mom-PI124Ind/PI414723 и подвид *agrestis* дикие типы: Ag-WM9Ind/WM9, Ag-WM7Ind/WM7), которые обладают устойчивостью к ToLCNDV, выявленной Lopez *et al.*, 2015, Euphytica 204(3), 679-691.

В соответствии с еще одним аспектом донорское растение по изобретению не является образцом, принадлежащим подвиду (аббревиатура: «ssp» или «subsp») *agrestis*, т.е. оно не является образцом *Cucumis melo* ssp *agrestis*, в частности, в соответствии с одним аспектом донорское растение не является образцом *Cucumis melo* ssp *agrestis* сорт *acidulous*. В соответствии с одним аспектом устойчивое донорское растение является образцом *Cucumis melo* ssp. *melo*.

Термин «разведение» в настоящем документе включает скрещивание, обратное скрещивание, самоопыление, селекцию, получение двойных гаплоидов, эмбриональное спасение, слияние протопластов, селекцию с помощью маркеров, мутационную селекцию и другие методы, известные селекционеру (то есть иные методы, которые не включают генетическую модификацию), с помощью которых, например, может осуществляться получение, идентификация и/или перенос рекомбинантной хромосомы 11 или 12.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения фрагмент интрогрессии происходит из дикого растения *Cucumis* или дикого образца или местного сорта *Cucumis*, наиболее предпочтительно фрагмент интрогрессии происходит из дикого *Cucumis melo* ssp. *melo*, которое обладает одной или

несколькими из следующих характеристик: низкое содержание сухих веществ или низкое процентное содержание TSS (общее содержание растворимых твердых веществ, например, TSS менее 6% или менее 5,5%), плодоножка может очень легко отделяться после созревания (в соответствии со следующей шкалой: очень легко, легко, средне, трудно, очень трудно, см. характеристику 39 UPOV (Международного союза по охране новых сортов растений), Кодекс UPOV, версия TG/104/5, CUCUM_MEL, доступно по адресу: UPOV.int); очень короткий срок годности плода (в соответствии со следующей шкалой: очень короткий, короткий, средний, долгий, очень долгий, см. характеристику 68 UPOV (Международного союза по охране новых сортов растений), Кодекс UPOV, версия TG/104/5, CUCUM_MEL, доступно по адресу: UPOV.int).

«Сорт растения» представляет собой группу растений в пределах одного ботанического таксона низшего известного класса, которая (независимо от того, выполнены или нет условия для признания права на защиту созданного сорта растения) может быть определена на основе экспрессии характеристик, которые получают из определенного генотипа или комбинации генотипов, которую можно отличить от любой другой группы растений на основании экспрессии, по меньшей мере, одной из этих характеристик, и которая может рассматриваться как единое целое, потому что при размножении таких растений не происходит каких-либо изменений. Таким образом, термин «сорт растения» не может использоваться для обозначения группы растений, даже если они того же рода, если все они характеризуются наличием одного или двух локусов или генов (или фенотипических характеристик в связи с такими специфическими локусами или генами), но в противном случае могут чрезвычайно отличаться друг от друга относительно других локусов и генов.

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

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

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

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

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

В контексте настоящего изобретения «хромосома 11 растения дыни» означает скаффолды, фрагменты, области, маркеры и нуклеотидные последовательности, которые принадлежат хромосоме 11 генома дыни в соответствии с данными ICuGI (Международной инициативы по геному тыквенных культур) или предпочтительно принадлежат хромосоме 11 в соответствии с данными melonomics.net. На сайте melonomics.net может осуществляться выравнивание последовательностей с помощью BLAST относительно геномных скаффолдов дыни согласно старой версии Melonomics (v3.5) или относительно генома дыни согласно версии CM3.5.1 или CM3.6.1 (новая версия Melonomics v4.0).

Термин «ортологичная хромосома 11» относится к хромосоме 11 растений-доноров, части которой могут быть интрогрессированы в культурное растение дыни.

В контексте настоящего изобретения «хромосома 12 растения дыни» означает скаффолды, фрагменты, области, маркеры и нуклеотидные последовательности, которые принадлежат хромосоме 12 генома дыни в соответствии с данными ICuGI (Международной инициативы по геному тыквенных культур) или предпочтительно

принадлежат хромосоме 12 в соответствии с данными melonomics.net.

Термин «ортологичная хромосома 12» относится к хромосоме 12 растений-доноров, части которой могут быть интрогрессированы в культурное растение дыни.

В настоящем документе термин «ICuGI» относится к данным о *Cucumis melo*, опубликованным Международной инициативой по геному тыквенных культур, которая публикует генетические карты, например, *Cucumis melo* (http://www.icugi.org/cgi-bin/cmap/map_set_info?species_acc=CM), которые однако были обновлены в мае 2017 г. и доступны по адресу cucurbitgenomics.org. Дополнительную информацию, включая дополнительную информацию о маркерах и информацию о картировании в дополнение к данным ICuCI, можно найти в работе Diaz et al. (2015, Mol Breeding 35, 188), а также в дополнительных данных, включенных в онлайн-версию соответствующей статьи.

Скаффолд CM3.5_scaffold00052 согласно melonomics.net соответствует хромосоме 11 (согласно старой версии Melonomics v3.5). Скаффолд CM3.5_scaffold00004 согласно melonomics.net соответствует хромосоме 12 (согласно старой версии Melonomics v3.5). Если осуществляется BLAST любой из последовательностей SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 7 в соответствии с настоящим документом относительно последовательности генома дыни, опубликованной в базе данных melonomics.net (старая версия Melonomics v3.5), будет показано выравнивание со скаффолдом. Если осуществляется BLAST любой из SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 7 в соответствии с настоящим документом относительно генома CM3.6.1 или генома CM3.5.1 (новая версия Melonomics v4.0), будут показаны хромосома и выравнивание с хромосомной частью генома.

Термин «культурное растение дыни» означает растения вида *Cucumis melo*, т.е. разновидности, линии скрещивания или сорта вида *C. melo*, которые культивируются человеком и имеют высокие агрономические характеристики, в частности, растения, дающие съедобные плоды, обладающие нормальным рыночным качеством, хорошего размера и качества, а также обладающие достаточной однородностью; предпочтительно такие растения не являются растениями «дикого типа», т.е. растениями, которые, как правило, обладают значительно меньшей урожайностью и худшими агрономическими характеристиками по сравнению с культурными растениями, и которые, например,

растут в природных условиях в диких популяциях. «Растения дыни дикого типа» включают, например, экотипы, линии интродукции растений, местные сорта, дикие образцы или дикие родственники вида.

В контексте настоящего изобретения термин «SNP» (= одиночный нуклеотидный полиморфизм) означает вариацию в единственном нуклеотиде, которая происходит в определенном положении в геноме. SNP – это вариация одного нуклеотида в определенном положении в геноме двух растений. Если дикое растение дыни, обладающее устойчивостью к ToLCNDV (растение-донор), в соответствующей последовательности в определенной отдельной позиции имеет нуклеотид, отличный от соответствующего нуклеотида в том же положении культурного растения дыни, это положение определяет SNP между дикой и культурной дыней. Если растение-донор имеет один из четырех возможных нуклеотидов (A, C, T или G) в определенном положении, SNP возникает, если культурное растение имеет один из оставшихся трех возможных нуклеотидов в том же соответствующем положении последовательности. Поэтому в культурном растении дыни, содержащем фрагмент интрогрессии от донора, можно легко определить, получен ли единственный нуклеотид SNP от донора или от культурной дыни (реципиента).

“SNP_01”, который альтернативно обозначен как “mME72223”, следует понимать в контексте настоящего изобретения как SNP в положении 101 в SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO:1 или последовательность, по существу идентичная с SEQ ID NO:1, может быть обнаружена на хромосоме 11, например, в пакете данных ICuGI или на melonomics.net. Соответствующее положение SNP_01 на физической хромосоме может быть найдено в Таблице 2. Также показано положение на геномной версии CM3.6.1 (New Melonomics v4.0). Предпочтительно нуклеотидная последовательность, содержащая SNP_01, имеет нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1, более предпочтительно, по меньшей мере, 90% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1, также более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1,

еще более предпочтительно, по меньшей мере, 98% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1, в частности, предпочтительно, по меньшей мере, 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1 при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 101 в SEQ ID NO: 1 отличается от соответствующего нуклеотида в таком же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, рассматриваются как имеющие значительную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1.

Устойчивое к ToLCNDV донорское растение, используемое в изобретении, имеет 'A' (аденин) в положении 101 SEQ ID NO: 1. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_01 отличается тем, что рекуррентное растение имеет C, G или T в положении 101 в SEQ ID NO: 1. В одном аспекте рекуррентное растение имеет G в положении 101 в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_01 отличается тем, что устойчивое к ToLCNDV донорское растение или фрагмент интрогрессии, полученный из донорского растения, имеет 'A' в положении 101 в SEQ ID NO: 1, и рекуррентное растение имеет G в положении 101 в SEQ ID NO: 1, или C в положении 101, или T в положении 101 SEQ ID NO: 1 (или в эквивалентном положении последовательности, содержащей по существу идентичные последовательности с SEQ ID NO: 1).

“SNP_02”, который альтернативно обозначается как “mME72233”, следует понимать в контексте настоящего изобретения как SNP в положении 101 в SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO:2 или последовательность, по существу идентичная с SEQ ID NO:2, может быть обнаружена на хромосоме 11, например, в пакете данных ICuGI или на melonomics.net. Соответствующее положение SNP_02 на физической хромосоме может быть найдено в Таблице 2. Также показано положение на геномной версии CM3.6.1 (New Melonomics v4.0). Предпочтительно нуклеотидная последовательность, содержащая SNP_02 имеет нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 2, более предпочтительно, по меньшей мере, 90% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 2, также более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью,

показанной под SEQ ID NO: 2, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 2, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 98% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 2, в частности, предпочтительно, по меньшей мере, 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 2 при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 101 в SEQ ID NO: 2 отличается от соответствующего нуклеотида в таком же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, рассматриваются как имеющие значительную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

Устойчивое к ToLCNDV донорское растение, используемое в изобретении, имеет 'G' (гуанин) в положении 101 SEQ ID NO: 2. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_02 отличается тем, что рекуррентное растение имеет C, A или T в положении 101 в SEQ ID NO: 2. В одном аспекте рекуррентное растение имеет 'A' в положении 101 в SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_02 отличается тем, что устойчивое к ToLCNDV донорское растение или фрагмент интрогрессии, полученный из донорского растения, имеет 'G' в положении 101 в SEQ ID NO: 2, и рекуррентное растение имеет 'A' в положении 101 в SEQ ID NO: 2, или C в положении 101, или T в положении 101 SEQ ID NO: 2 (или в эквивалентном положении последовательности, содержащей по существу идентичные последовательности с SEQ ID NO: 2).

“SNP_03”, который альтернативно обозначается как “mME72238”, следует понимать в контексте настоящего изобретения как SNP в положении 101 в SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO:3 или последовательность, по существу идентичная с SEQ ID NO:3, может быть обнаружена на хромосоме 11, например, в пакете данных ICuGI или на melonomics.net. Соответствующее положение SNP_03 на физической хромосоме может быть найдено в Таблице 2. Также показано положение на геномной версии CM3.6.1 (New Melonomics v4.0). Предпочтительно нуклеотидная последовательность, содержащая SNP_03 имеет нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3, более предпочтительно, по меньшей мере, 90% идентичности с нуклеотидной

последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3, также более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 98% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3, в частности, предпочтительно, по меньшей мере, 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3 при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 101 в SEQ ID NO: 3 отличается от соответствующего нуклеотида в таком же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, рассматриваются как имеющие значительную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3.

Устойчивое к ToLCNDV донорское растение, используемое в изобретении, имеет 'Т' (Тимин) в положении 101 SEQ ID NO: 3. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_03 отличается тем, что рекуррентное растение имеет С, А или G в положении 101 в SEQ ID NO: 3. В одном аспекте рекуррентное растение имеет С в положении 101 в SEQ ID NO: 3. В одном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_03 отличается тем, что устойчивое к ToLCNDV донорское растение или фрагмент интрогрессии, полученный из донорского растения, имеет 'Т' в положении 101 в SEQ ID NO: 3, и рекуррентное растение имеет С в положении 101 в SEQ ID NO: 3, или А в положении 101, или G в положении 101 SEQ ID NO: 3 (или в эквивалентном положении последовательности, содержащей по существу идентичные последовательности с SEQ ID NO: 3).

"SNP_04", который альтернативно обозначается как "mME72245", следует понимать в контексте настоящего изобретения как SNP в положении 101 в SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO:4 или последовательность, по существу идентичная с SEQ ID NO:4, может быть обнаружена на хромосоме 11, например, в пакете данных ICuGI или на melonomics.net. Соответствующее положение SNP_04 на физической хромосоме может быть найдено в Таблице 2. Также показано положение на геномной версии CM3.6.1 (New Melonomics v4.0). Предпочтительно нуклеотидная последовательность, содержащая SNP_04 имеет нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с

нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4, более предпочтительно, по меньшей мере, 90% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4, также более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 98% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4, в частности, предпочтительно, по меньшей мере, 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4 при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 101 в SEQ ID NO: 4 отличается от соответствующего нуклеотида в таком же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, рассматриваются как имеющие значительную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4.

Устойчивое к ToLCNDV донорское растение, используемое в изобретении, имеет 'Т' (Тимин) в положении 101 SEQ ID NO: 4. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_04 отличается тем, что рекуррентное растение имеет С, А или G в положении 101 в SEQ ID NO: 4. В одном аспекте рекуррентное растение имеет С в положении 101 в SEQ ID NO: 4. В одном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_04 отличается тем, что устойчивое к ToLCNDV донорское растение или фрагмент интрогрессии, полученный из донорского растения, имеет 'Т' в положении 101 в SEQ ID NO: 4, и рекуррентное растение имеет С в положении 101 в SEQ ID NO: 4, или А в положении 101, или G в положении 101 SEQ ID NO: 4 (или в эквивалентном положении последовательности, содержащей по существу идентичные последовательности с SEQ ID NO: 4).

"SNP_05", который альтернативно обозначается как "mME72255", следует понимать в контексте настоящего изобретения как SNP в положении 101 в SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO:5 или последовательность, по существу идентичная с SEQ ID NO:5, может быть обнаружена на хромосоме 12, например, в пакете данных ICuGI или на melonomics.net. Соответствующее положение SNP_05 на физической хромосоме может быть найдено в Таблице 2. Также показано положение на геномной версии CM3.6.1 (New Melonomics v4.0). Предпочтительно нуклеотидная

последовательность, содержащая SNP_05 имеет нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 5, более предпочтительно, по меньшей мере, 90% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 5, также более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 5, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 5, в частности, предпочтительно, по меньшей мере, 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 5 при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 101 в SEQ ID NO: 5 отличается от соответствующего нуклеотида в таком же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, рассматриваются как имеющие значительную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5.

Устойчивое к ToLCNDV донорское растение, используемое в изобретении, имеет 'C' (цитозин) в положении 101 SEQ ID NO: 5. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_05 отличается тем, что рекуррентное растение имеет G, A или T в положении 101 в SEQ ID NO: 5. В одном аспекте рекуррентное растение имеет T в положении 101 в SEQ ID NO: 5. В одном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_05 отличается тем, что устойчивое к ToLCNDV донорское растение или фрагмент интрогрессии, полученный из донорского растения, имеет 'C' в положении 101 в SEQ ID NO: 5, и рекуррентное растение имеет T в положении 101 в SEQ ID NO: 5, или G в положении 101 или A в положении 101 SEQ ID NO: 5 (или в эквивалентном положении последовательности, содержащей по существу идентичные последовательности с SEQ ID NO: 5).

“SNP_06”, который альтернативно обозначается как “mME72261”, следует понимать в контексте настоящего изобретения как SNP в положении 101 в SEQ ID NO: 6. SEQ ID NO:6 или последовательность, по существу идентичная с SEQ ID NO:6, может быть обнаружена на хромосоме 12, например, в пакете данных ICuGI или на melonomics.net. Соответствующее положение SNP_06 на физической

хромосоме может быть найдено в Таблице 2. Также показано положение на геномной версии CM3.6.1 (New Melonomics v4.0). Предпочтительно нуклеотидная последовательность, содержащая SNP_06 имеет нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 6, более предпочтительно, по меньшей мере, 90% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 6, также более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 6, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 6, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 98% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 6, в частности, предпочтительно, по меньшей мере, 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 6 при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 101 в SEQ ID NO: 6 отличается от соответствующего нуклеотида в таком же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6, рассматриваются как имеющие значительную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6.

Устойчивое к ToLCNDV донорское растение, используемое в изобретении, имеет 'G' (Гуанин) в положении 101 SEQ ID NO: 6. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_06 отличается тем, что рекуррентное растение имеет C, A или T в положении 101 в SEQ ID NO: 6. В одном аспекте рекуррентное растение имеет A в положении 101 в SEQ ID NO: 6. В одном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_06 отличается тем, что устойчивое к ToLCNDV донорское растение или фрагмент интрогрессии, полученный из донорского растения, имеет 'G' в положении 101 в SEQ ID NO: 6, и рекуррентное растение имеет A в положении 101 в SEQ ID NO: 6, или C в положении 101, или T в положении 101 SEQ ID NO: 6 (или в эквивалентном положении последовательности, содержащей по существу идентичные последовательности с SEQ ID NO: 6).

“SNP_07”, который альтернативно обозначается как “mME72279”, следует понимать в контексте настоящего изобретения как SNP в положении 101 в SEQ ID NO: 7. SEQ ID NO:7 или последовательность, по существу идентичная с SEQ ID

NO:7, может быть обнаружена на хромосоме 12, например, в пакете данных ICuGI или на melonomics.net. Соответствующее положение SNP_07 на физической хромосоме может быть найдено в Таблице 2. Также показано положение на геномной версии CM3.6.1 (New Melonomics v4.0). Предпочтительно нуклеотидная последовательность, содержащая SNP_07 имеет нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 7, более предпочтительно, по меньшей мере, 90% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 7, также более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 7, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 7, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 98% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 7, в частности, предпочтительно, по меньшей мере, 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 7 при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 101 в SEQ ID NO: 7 отличается от соответствующего нуклеотида в таком же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7, рассматриваются как имеющие значительную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7.

Устойчивое к ToLCNDV донорское растение, используемое в изобретении, имеет 'Т' (Тимин) в положении 101 SEQ ID NO: 7. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_07 отличается тем, что рекуррентное растение имеет С, А или G в положении 101 в SEQ ID NO: 7. В одном аспекте рекуррентное растение имеет С в положении 101 в SEQ ID NO: 7. В одном варианте осуществления настоящего изобретения SNP_07 отличается тем, что устойчивое к ToLCNDV донорское растение или фрагмент интрогрессии, полученный из донорского растения, имеет 'Т' в положении 101 в SEQ ID NO: 7, и рекуррентное растение имеет С в положении 101 в SEQ ID NO: 7, или G в положении 101 или а А в положении 101 SEQ ID NO: 7 (или в эквивалентном положении последовательности, содержащей по существу идентичные последовательности с SEQ ID NO: 7).

Таблица 2

Хро- мо- со- ма	Наименование маркера	Скаффолд (адрес в Интернете: melonomics.net, старая версия Melonomics v3.5)	Нуклеотидное положение SNP на scaffold00052 или scaffold0004	Физическое положение на хромосоме 11 или 12 согласно Diaz et al. 2015*, например, Фиг. 1	Нуклеотидное положение SNP в геноме дыни, версия CM3.6.1 (новая версия Melonomics v4.0), на хромосоме 11 или хромосоме 12, соответственно
11	CMPSNP475	Scaffold00052	1308124	30277435	
11	SNP_01 (mME72223)	Scaffold00052	1256506		33240885
11	SNP_02 (mME72233)	Scaffold00052	777406		32761709
11	SNP_03 (mME72238)	Scaffold00052	513312		32497404
11	SNP_04 (mME72245)	Scaffold00052	90616		32074519
11	ECM192	Scaffold00052	32422	29001733	
12	CMPSNP2002	Scaffold00004	255636	12534642	
12	SNP_05 (mME72255)	Scaffold00004	3413496		9379373
12	SNP_06 (mME72261)	Scaffold00004	4297467		8494993
12	SNP_07 (mME72279)	Scaffold00004	6896770		5895390
12	CMPSNP310	Scaffold00004	7646165	5144113	

* нуклеотидное положение SNP на основании положения в Diaz et al. 2015, Mol Breeding 35:188, p 1-7.

Как можно видеть, SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04 находятся между CMPSNP475 (у 30,27 Мб) и ECM192 (у 29,0 Мб) на физической хромосоме 11, то есть в нижней половине хромосомы 11. На геноме CM3.6.1 SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04 находятся в области, начинающейся у 32,07 Мб и заканчивающейся у 33,24 Мб хромосомы 11.

SNP_05, SNP_06 и SNP_07 находятся между CMPSNP2002 (у 12,5 Мб) и CMPSNP310 (у 5,1 Мб) на физической хромосоме 12, то есть в верхней половине хромосомы 12. На геноме CM3.6.1 SNP_05, SNP_06 и SNP_07 находятся в области, начинающейся у 5,89 Мб и заканчивающейся у 9,37 Мб хромосомы 12.

Описанные в настоящем документе молекулярные маркеры могут быть обнаружены стандартными методами. Например, маркеры SNP могут быть обнаружены путем KASP-анализа (см. www.kpbioscience.co.uk) или других видов анализа. Для описанных в настоящем документе SNP был разработан KASP-анализ. Более подробная информация представлена в разделе «Примеры». Последовательности, используемые в соответствующих KASP-анализах, приведены в перечне последовательностей. Для разработки KASP-анализов для SNP в соответствии с сведениями общедоступного характера в этой области были разработаны два аллель-специфических прямых праймера и один аллель-специфический обратный праймер (см., например, Allen et al. 2011, *Plant Biotechnology J.* 9, 1 0 86-1 099, в частности, стр. 097-098 для метода KASP-анализа).

«Идентичность последовательности» и «сходство последовательности» можно определить путем выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритмов глобального или локального выравнивания. Таким образом, последовательности могут именоваться «существенно идентичными» или «с существенной степенью идентичности», когда они имеют определенный общий минимальный процент идентичности последовательности (в соответствии с определением ниже) при оптимальном выравнивании с использованием программных средств GAP или BESTFIT или программы Needle (пакет Emboss) с параметрами по умолчанию, см. ниже. Эти программы используют алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей длине, получая максимальное количество совпадений и сводя к минимуму количество делеций. Обычно используют параметры по умолчанию, штраф на внесение делеции = 10, штраф на продолжение делеции = 0,5 (как для выравнивания нуклеотидных последовательностей, так и выравнивания последовательностей белков). Для нуклеотидов по умолчанию используют матрицу замен DNAFULL, а для белков – Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1 992, *PNAS* 89, 1 09 1 5-1 09 1 9). Выравнивания последовательности и показатели процента идентичности последовательности, например, могут быть определены с помощью компьютерных программ, таких как EMBOS, которая доступна по адресу: ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). В качестве альтернативы процент сходства или идентичности может определяться путем поиска в базах данных, таких как FASTA, BLAST и т.д., однако для сравнения

идентичности последовательности совпадения предпочтительно должны быть получены и приведены в соответствие попарно. Два белка или два белковых домена или две нуклеотидные последовательности имеют «существенную идентичность последовательности», если процент идентичности последовательности составляет, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% (в соответствии с определением для программы Needle (пакет Emboss) с использованием параметров по умолчанию, т.е.: штраф на внесение делеции = 10, штраф на продолжение делеции = 0,5, с использованием матрицы замен DNAFULL для нуклеиновых кислот и Blosum62 для белков). При упоминании по тексту нуклеотидной последовательности (например, ДНК или геномной ДНК) с «существенной идентичностью последовательности» с эталонной последовательностью или с идентичностью нуклеотидной последовательности 80%, например, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,2%, 99,5%, 99,9% с эталонной последовательностью, в соответствии с одним вариантом реализации изобретения считается, что указанная нуклеотидная последовательность имеет существенную идентичность последовательности с определенной нуклеотидной последовательностью и может быть идентифицирована с использованием жестких условий гибридизации. В еще одном варианте реализации изобретения нуклеотидная последовательность содержит одну или несколько мутаций по сравнению с определенной нуклеотидной последовательностью, однако она все же может быть идентифицирована с использованием жестких условий гибридизации.

Для культурных растений дыни, содержащих фрагмент, придающий устойчивость к ToLCNDV, интрогрессированный донор на хромосоме 11 и/или 12, демонстрируется снижение симптомов при инфицировании ToLCNDV, в то время для контрольных чувствительных растений (без фрагментов интрогрессии на хромосоме 11 и 12) в тех же условиях проявляются ожидаемые тяжелые симптомы.

В предпочтительном варианте реализации изобретения растения или клетки растения по настоящему изобретению характеризуются тем, что после их инфицирования ToLCNDV средняя степень выраженности симптомов (или средний индекс активности заболевания) составляет, по меньшей мере, 7,0, более предпочтительно, по меньшей мере, 8,0 или 9,0. Как было указано ранее, QTL11 придает высокие уровни устойчивости, когда QTL находится в гомозиготной форме. Из восприимчивого к ToLCNDV растения, в которое вводят фрагмент интрогрессии,

содержащий QTL11, путем, например, обратного скрещивания, и самоопыление которого, при необходимости, осуществляется для получения гомозиготного фрагмента интрогрессии (содержащего генотип донора для одного SNP или нескольких SNP или для всех SNP из SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04 в гомозиготной форме), получают растение, обладающее высокой устойчивостью к инфицированию ToLCNDV, средний индекс активности заболевания которого составляет, по меньшей мере, 7,0, предпочтительно, по меньшей мере, 8,0 или предпочтительно, по меньшей мере, 9,0 QTL12 придает менее высокий уровень устойчивости по сравнению с QTL11, однако частично доминантным образом. Из восприимчивого к ToLCNDV растения, в которое вводят фрагмент интрогрессии, содержащий QTL12, путем, например, обратного скрещивания, и самоопыление которого, при необходимости, осуществляется для получения гомозиготного фрагмента интрогрессии (содержащего генотип донора для одного SNP или нескольких SNP или для всех SNP из SNP_05, SNP_06 и SNP_07 в гетерозиготной или гомозиготной форме), получают растение, обладающее более высокой устойчивостью, средний индекс активности заболевания которого составляет, по меньшей мере, 5,0, предпочтительно, по меньшей мере, 6,0

Уровни выраженности симптомов, возникающие после заражения ToLCNDV, оценивают по шкале от 1 до 9, где 1 определяют как уровень с наиболее тяжелыми симптомами, а 9 определяют как наивысший уровень устойчивости, были описаны в настоящем документе выше и применяют соответственно. Предпочтительный тест для определения уровней выраженности симптомов приведен ниже в разделе «Общие методы».

Устойчивость к ToLCNDV, которая придается фрагментом интрогрессии на хромосоме 11, выражается рецессивным образом, таким образом, она может наблюдаться, когда обе хромосомы 11 содержат фрагмент интрогрессии, содержащий QTL11 и генотип донора для одного SNP или нескольких SNP или для всех SNP из SNP-маркеров, предусмотренных настоящим документом (SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04) и/или фрагмент интрогрессии, содержащий последовательность растения-донора между SNP-маркерами хромосомы 11, описанными в настоящем документе.

Устойчивость к ToLCNDV, которая придается фрагментом интрогрессии на хромосоме 12, выражается доминантным образом, таким образом, она может

наблюдаться, когда одна из хромосом 12 содержит фрагмент интрогрессии, содержащий QTL12 и генотип донора для одного SNP или нескольких SNP или для всех SNP из SNP-маркеров, предусмотренных настоящим документом (SNP_05, SNP_06 и SNP_07) и/или фрагмент интрогрессии, содержащий последовательность растения-донора между SNP-маркерами хромосомы 12, описанными в настоящем документе.

Средний индекс активности заболевания ToLCNDV у растения, содержащего оба QTL11 в гомозиготной форме и QTL12 в гетерозиготной или в гомозиготной форме, будет составлять, по меньшей мере, 8,0, предпочтительно, по меньшей мере, 9,0, т.е. такие растения обладают высокой устойчивостью. Такое растение имеет преимущество в том, что устойчивость обеспечивается на основании двух разных QTL, а это означает, что нарушение устойчивости маловероятно.

Таким образом, другие частные варианты реализации изобретения относятся к культурным растениям дыни, частям или клеткам растений дыни по настоящему изобретению, в которых фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, содержащий последовательность растения-донора между SNP_01 и SNP_04 или между SNP_01 и SNP_03 или между SNP_01 и SNP_02 или между SNP_02 и SNP_04 или между SNP_02 и SNP_03 или между SNP_03 и SNP_04, присутствует в гетерозиготном состоянии. Указанный фрагмент интрогрессии содержит QTL11, следовательно, он придает растению высокую устойчивость к ToLCNDV.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к культурным растениям дыни, частям или клеткам растений дыни по настоящему изобретению, в которых фрагмент интрогрессии из хромосомы 12 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, содержащий последовательность растения-донора между SNP_05 и SNP_06 или между SNP_06 и SNP_07 или между SNP_05 и SNP_07, присутствует в гетерозиготном или гомозиготном состоянии. Указанный фрагмент интрогрессии содержит QTL12, следовательно, он придает растению устойчивость к ToLCNDV.

В соответствии с еще одним аспектом предоставляется культурное растение, часть растения или клетка растения дыни, которые в своем геноме содержат оба QTL11 (в гомозиготной форме) и QTL12 (в гетерозиготной или гомозиготной

форме), то есть они содержат два фрагмента интрогрессии в соответствии с описанием выше и в других местах по тексту настоящего документа. Такое растение дыни может быть получено, например, путем скрещивания растения, содержащего QTL11, с растением, содержащим QTL12, и отбора потомства, которое содержит оба фрагмента интрогрессии и оба QTL. Кроме того, внесенные в базу семена, предоставляемые в соответствии с настоящим документом, включает оба QTL в гомозиготной форме (причем генотип резистентного донора присутствует в гомозиготной форме для SNP_01, SNP_02, SNP_03, SNP_04, SNP_05, SNP_06 и SNP_07) можно использовать для переноса обоих QTL в любую другую линию или сорт культурной дыни путем скрещивания растения с другим растением дыни и, при необходимости, путем отбора растений-потомков, содержащих генотип резистентного донора для, по меньшей мере, одного маркера SNP, выбранного из SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04, и, по меньшей мере, одного маркера SNP, выбранного из SNP_05, SNP_06 и SNP_07, предпочтительно, по меньшей мере, одного маркера SNP, выбранного из SNP_05 и SNP_06. При необходимости, может осуществляться тестирование потомства на устойчивость к ToLCNDV в соответствии с описанием. Предпочтительно (но не обязательно), как QTL11, так и QTL12 получены из одного и того же донорского растения.

В Таблице 3 приведен генотип SNP растений дыни или клеток растений дыни, содержащих донорные SNP в гомозиготной или гетерозиготной форме, а также генотип SNP рекуррентного родительского растения, в котором отсутствует фрагмент интрогрессии.

SNP и положение нуклеотида (nt) в последовательности	Генотип SNP в растении дыни, включающем донорный фрагмент в гомозиготной форме	Генотип SNP в растении дыни, включающем донорный фрагмент в гетерозиготной форме	Генотип SNP рекуррентного родителя, в котором фрагмент интрогрессии отсутствует
SNP_01 (nt 101 SEQ ID NO 1)	AA	AG	GG
SNP_02 (nt 101 SEQ ID NO 2)	GG	AG	AA

SNP_03 (nt 101 SEQ ID NO 3)	TT	TC	CC
SNP_04 (nt 101 SEQ ID NO 4)	TT	TC	CC
SNP_05 (nt 101 SEQ ID NO 5)	CC	TC	TT
SNP_06 (nt 101 SEQ ID NO 6)	GG	AG	AA
SNP_07 (nt 101 SEQ ID NO 7)	TT	TC	CC

В соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от донора на хромосоме 11, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии находится между SNP_01 и SNP_04, и при этом фрагмент интрогрессии содержит тимин (T) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 3 или в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3. В соответствии с еще одним аспектом фрагмент интрогрессии также содержит тимин (T) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 4 или в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4, и/или фрагмент интрогрессии также содержит гуанин (G) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 2 или в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2. В соответствии с еще одним аспектом фрагмент интрогрессии также содержит устойчивый донорский нуклеотид SNP_01.

В соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от донора на хромосоме 11, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии находится между SNP_01 и SNP_04, и при этом фрагмент интрогрессии содержит тимин (T) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 3 или в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3, и фрагмент интрогрессии, при необходимости, также содержит устойчивый донорский нуклеотид SNP_02 и/или

SNP_01. При необходимости, фрагмент интрогрессии также содержит донорный генотип SNP для SNP_04.

В соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от донора на хромосоме 11, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии содержит донорную геномную последовательность между, по меньшей мере, SNP_02 и SNP_03, при необходимости, включая донорный нуклеотид SNP для одного или обоих этих маркеров SNP. Таким образом, при необходимости, фрагмент интрогрессии содержит SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, а нуклеотидная последовательность между SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 также из устойчивого донора. Таким образом, фрагмент интрогрессии содержит всю область из SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 3.

В соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от донора на хромосоме 11, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии содержит донорную геномную последовательность между, по меньшей мере, SNP_04 и SNP_03, при необходимости, включая донорный нуклеотид SNP для одного или обоих этих маркеров SNP. Таким образом, при необходимости, фрагмент интрогрессии содержит SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 3, а нуклеотидная последовательность между SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 3 также из устойчивого донора. Таким образом, фрагмент интрогрессии содержит всю хромосомную область из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 3.

В соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от донора на хромосоме 11, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии содержит донорную геномную последовательность между, по меньшей мере, SNP_04 и SNP_02, при необходимости, включая донорный нуклеотид SNP для одного или обоих этих маркеров SNP. Таким образом, при необходимости, фрагмент интрогрессии содержит SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 2, а нуклеотидная последовательность между SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 2 также из устойчивого донора. Таким образом, в этом аспекте вся хромосомная область SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 4 происходит из донора и содержит SEQ ID NO: 2, 3 и 4.

В соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от донора на хромосоме 11, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии содержит донорную геномную последовательность между, по меньшей мере, SNP_01 и SNP_03, при необходимости, включая донорный нуклеотид SNP для одного или обоих этих маркеров SNP. Таким образом, при необходимости, фрагмент интрогрессии содержит SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3, а нуклеотидная последовательность между SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3 также из устойчивого донора. Таким образом, в этом аспекте вся хромосомная область SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 3 происходит из донора и содержит SEQ ID NO: 1, 2 и 3.

В соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от донора на хромосоме 11, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии содержит донорную геномную последовательность между, по меньшей мере, SNP_01 и SNP_04, при необходимости, включая донорный нуклеотид SNP для одного или обоих этих маркеров SNP. Таким образом, при необходимости, фрагмент интрогрессии содержит SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 4, а нуклеотидная последовательность между SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 4 также из устойчивого донора. Таким образом, в этом аспекте вся хромосомная область SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 4 происходит из донора и содержит SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 4. Фрагмент интрогрессии, присутствующий во внесенных в базу семенах, содержит SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 4. Тем не менее, поскольку SNP_03 наиболее тесно связан с фенотипом устойчивости, фрагмент интрогрессии может быть уменьшен в размере при сохранении QTL. Таким образом, например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 1 и 2 могут быть удалены путем рекомбинации внутри фрагмента интрогрессии и замещены последовательностями культурной дыни. Или SEQ ID NO: 4 может быть удалена путем рекомбинации внутри фрагмента интрогрессии и замещена последовательностями культурной дыни. Или, например, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 4 может быть удалена путем рекомбинации с обеих сторон фрагмента интрогрессии. Аналогичным образом, например, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 с одной стороны и SEQ ID NO: 4 с другой стороны фрагмента интрогрессии может быть удалена путем рекомбинации.

В соответствии с еще одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от донора на хромосоме 12, причем

этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии содержит гуанин (G) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 6 или в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6. В соответствии с еще одним аспектом фрагмент интрогрессии также содержит цитозин (C) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 5 или в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, и/или фрагмент интрогрессии также содержит тимин (T) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 7 или в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7.

В соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от донора на хромосоме 12, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии содержит донорную геномную последовательность, по меньшей мере, между SNP_06 и SNP_05, при необходимости, включая донорный нуклеотид SNP для одного или обоих этих маркеров SNP. Таким образом, при необходимости, фрагмент интрогрессии содержит SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 5, а нуклеотидная последовательность между SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 5 также из устойчивого донора. Таким образом, фрагмент интрогрессии содержит всю хромосомную область из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 5.

В соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от донора на хромосоме 12, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии содержит донорную геномную последовательность, по меньшей мере, между SNP_06 и SNP_07, при необходимости, включая донорный нуклеотид SNP для одного или обоих этих маркеров SNP. Таким образом, при необходимости, фрагмент интрогрессии содержит SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, а нуклеотидная последовательность между SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 также из устойчивого донора. Таким образом, фрагмент интрогрессии содержит всю хромосомную область из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 7.

В соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от донора на хромосоме 12, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент

интрогрессии содержит донорную геномную последовательность, по меньшей мере, между SNP_05 и SNP_07, при необходимости, включая донорный нуклеотид SNP для одного или обоих этих маркеров SNP. Таким образом, при необходимости, фрагмент интрогрессии содержит SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 7, а нуклеотидная последовательность между SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 7 также из устойчивого донора. Таким образом, фрагмент интрогрессии содержит всю хромосомную область из SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 7. Фрагмент интрогрессии, присутствующий во внесенных в базу семенах, содержит SEQ ID NO: 5, 6 и 7. Тем не менее, поскольку SNP_06 наиболее тесно связан с фенотипом устойчивости, фрагмент интрогрессии может быть уменьшен в размере при сохранении QTL. Таким образом, например, SEQ ID NO: 5 и/или SEQ ID NO: 7 может быть удалена путем рекомбинации внутри фрагмента интрогрессии и замещена последовательностями культурной дыни.

Как упоминалось ранее, настоящее изобретение включает растения, части растений и клетки растений, содержащие как фрагмент интрогрессии на хромосоме 11, так и фрагмент интрогрессии на хромосоме 12.

Растения, содержащие клетки растений по изобретению, являются еще одним вариантом реализации настоящего изобретения.

Растение дыни по настоящему изобретению может представлять собой инбредную линию, свободноопыляемый сорт (COC) или гибрид F1.

В соответствии с одним аспектом гибрид F1 содержит фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и/или 12 в гетерозиготной форме, то есть фрагмент интрогрессии, полученный путем скрещивания двух инбредных родительских линий, одна из которых содержит фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и/или 12 (предпочтительно, но необязательно, в гомозиготной форме), и сбора семян гибрида F1, полученного в результате такого скрещивания. Гибрид F1 также может содержать фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и/или 12 в гомозиготной форме, то есть полученный путем скрещивания двух инбредных родительских линий, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и/или 12 в гомозиготной или гетерозиготной форме.

В предпочтительном аспекте растение дыни представляет собой гибрид F1 и содержит фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 в гомозиготной форме. При необходимости, гибрид F1 также содержит фрагмент интрогрессии на хромосоме 12

в гетерозиготной или, предпочтительно, в гомозиготной форме. Такой гибрид F1 предпочтительно получен путем скрещивания двух инбредных родительских линий, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и фрагмент интрогрессии на хромосоме 12, предпочтительно оба в гомозиготной форме. Настоящее изобретение также включает такие инбредные линии.

Растение дыни по настоящему изобретению может быть любого типа. Предпочтительно такое растение обладает хорошими агрономическими характеристиками и хорошими характеристиками качества плодов, такими, например, как большой средний размер плодов (по меньшей мере, 500 г, 600 г, 700 г, 800 г, 900 г, 1000 г или более), высокое содержание сухих веществ (например, среднее процентное содержание сухих веществ по рефрактометру от общего содержания растворимых твердых веществ составляет, по меньшей мере, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% или более), большое количество плодов на растении, плотная мякоть плодов и т.д.

В соответствии с одним аспектом культурные растения дыни и клетки растения дыни относятся к одному из следующих видов: *C. melo* сорт *cantalupensis*, *C. melo* сорт *inodorous* или *C. melo* сорт *reticulatus*.

В соответствии с одним аспектом культурное растение дыни по изобретению, содержащее один или два фрагмента интрогрессии, придающих устойчивость к ToLCNDV, включает одну характеристику или несколько характеристик или все следующие характеристики: среднее TSS в стадии зрелости, по меньшей мере, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%; не слишком легкое отделение плодоножки в стадии зрелости плода (характеристика UPOV 39, версия TG/104/5 Rev., Кодекс UPOV: CUCUM_MEL, доступно по адресу: UPOV.int); не слишком короткий срок годности плода (характеристика UPOV 68, версия TG/104/5 Rev., Кодекс UPOV: CUCUM_MEL, доступно по адресу: UPOV.int); не слишком продолговатая форма плода (характеристика UPOV 28, версия TG/104/5 Rev., Кодекс UPOV: CUCUM_MEL, доступно по адресу: UPOV.int).

Среднее процентное значение TSS (или содержание сухих веществ) может быть измерено способами, известными специалистам, например, с использованием цифрового ручного рефрактометра и путем измерения TSS нескольких зрелых плодов линии или сорта. См., например, Burger et al. 2003, J American Soc Hort Science

128(4): 537-540 на стр. 538, раздел «Измерение общего содержания растворимых твердых веществ».

Также в растения дыни по изобретению могут быть введены другие виды устойчивости, такие как устойчивость к одному или более из следующих заболеваний: бактериальное увядание, корневая гниль, завядание кроны, дынная ржавчина, настоящая мучнистая роса, вертициллезный вилт, серный ожог, парша, мозаика арбуза, ложная мучнистая роса, *Fusarium oxysporum* специализированная форма *melonis* (FOM) раса 0, *Fusarium oxysporum* специализированная форма *melonis* (FOM) раса 1, *Fusarium oxysporum* специализированная форма *melonis* (FOM) раса 2, *Fusarium oxysporum* специализированная форма *melonis* (FOM) раса 1.2, фузариозный вилт

R2, корневой нарост (нематода), антракноз, мозаика огурца и мозаика кабачка, и/или устойчивость к одному или более следующим вредителям: тля, огневка, чернотелка, жужелица, жук-блешка окаймлённая, клещи, жук-блешка одиннадцатиточечная, дынная кобылочка, дынный червь, *Acalymma trivittata* или дынный листовой минер. Также могут вводиться другие гены устойчивости к патогенным вирусам, грибам, бактериям или вредителям.

Частный аспект изобретения относится к растениям или клеткам растений, содержащим фрагмент интрогрессии по изобретению, при этом такой фрагмент интрогрессии можно получить (вывести) из семян, внесенных в базу под NCIMB 42625 (или такой фрагмент интрогрессии присутствует в таких семенах), или из их потомства. Внесенные в базу семена представляют собой культурные растения дыни, содержащие оба фрагмента интрогрессии в гомозиготной форме, причем донорный нуклеотид присутствует в гомозиготной форме для SNP_01, SNP_02, SNP_03, SNP_04, SNP_05, SNP_06 и SNP_07. Для QTL11, придающего устойчивость к ToLCNDV, было обнаружено, что наибольшую значимость имеет маркер SNP_03, а для QTL12 – SNP_06. Это означает, что размер участка донорной интрогрессии может быть уменьшен как на QTL11 и на QTL12 путем выбора рекомбинантов с меньшим размером фрагментов интрогрессии QTL11 и/или QTL12, т.е. с подфрагментами фрагментов, присутствующих во внесенных в базу семенах. Например, растения, содержащие субфрагменты таких фрагментов интрогрессии (причем указанные субфрагменты все-таки содержат QTL11 или QTL12, которые придают устойчивость к ToLCNDV), содержащие донорский генотип SNP для

SNP_03 (в отношении QTL11) и/или содержащие донорский генотип SNP для SNP_06 (в отношении QTL12), но имеющие генотип SNP рекуррентного родителя для одного или более или всех других SNP, могут получены способами, известными специалисту. Таким образом, растения дыни, содержащие субфрагменты, содержащие только один из донорских SNP (то есть один SNP из SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04 для QTL11 и один SNP из SNP_05, SNP_06 и SNP_07 для QTL12), но все еще сохраняющие QTL, придающий устойчивость, могут быть получены способами, известными специалисту. Специалист способен даже удалить все донорские SNP и при этом сохранить QTL. Можно секвенировать область хромосомы 11 и/или 12, чтобы определить, имеет ли растение фрагмент интрогрессии или субфрагмент, присутствующий в семенах, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42625 (или который может быть получен из таких семян). Кроме того, с помощью анализа устойчивости к ToLCNDV в соответствии с описанием в настоящем документе можно легко проверить, присутствует ли QTL11 и/или 12 в субфрагменте, который больше не содержит всех донорных SNP или даже не содержит ни одного из донорных SNP.

Фрагмент интрогрессии может быть идентифицирован различными методами, такими как полиморфные маркеры, предоставленные в соответствии с настоящим документом (маркеры SNP, полиморфные между донором и рекуррентным родителем), окрашивание хромосом или секвенирование генома дыни и идентификация хромосомных частей на хромосоме 11 и/или 12, которые являются интрогрессиями от конкретного донора. Нуклеотидная последовательность фрагмента интрогрессии будет специфической и уникальной для донорского образца, который использовался для интродукции признака. Например, для идентификации фрагмента интрогрессии от конкретного донора по изобретению, например, можно выполнить секвенирование всего генома внесенных в базу семян. Это, например, также осуществляли для томата, где геномные последовательности инбредных линий томата и гибридов использовали для идентификации фрагментов интрогрессии на хромосоме 6 и хромосоме 9 специфических диких образцов. См. Lin *et al.*, Nature Genetics, 12.10.2014 г., doi:10.1038/ng.3117, стр. 5, Фиг. 4.

Помимо растений дыни, настоящим изобретением предоставляются семена, из которых могут быть выращены такие растения.

Таким образом, один аспект настоящего изобретения относится к семенам дыни, которые содержат фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 и/или 12 устойчивого к ToLCNDV донорского растения, при этом указанный фрагмент интрогрессии содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни между SNP_01 и SNP_04 или между SNP_01 и SNP_03 или между SNP_01 и SNP_02 или между SNP_02 и SNP_04 или между SNP_02 и SNP_03 или между SNP_03 и SNP_04 для хромосомы 11; и/или при этом фрагмент интрогрессии содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни между SNP_05 и SNP_07 или между SNP_05 и SNP_06 или между SNP_06 и SNP_07 для хромосомы 12. Очевидно, фрагмент интрогрессии содержит QTL, придающий устойчивость. Таким образом, если фрагмент интрогрессии переносится в чувствительную к ToLCNDV линию или сорт дыни, в частности, в гомозиготной форме, тогда восприимчивая к ToLCNDV линия или сорт становятся устойчивыми или очень устойчивыми к ToLCNDV в соответствии с описанием. В соответствии с одним аспектом культурное растение дыни, содержащее фрагмент интрогрессии, содержащий QTL11 и/или QTL12, имеет средний балл заболевания 9,0 (симптомы отсутствуют), тогда как чувствительно контрольное растение проявляет ожидаемые симптомы.

В соответствии с еще одним аспектом вирус ToLCNDV не обнаруживается в верхних частях инокулированных устойчивых к ToLCNDV растений или обнаруживается только на очень низком уровне, см. раздел «Примеры». Таким образом, растения, содержащие QTL11 и/или QTL12 (например, донорское растение или растение, содержащее один или оба интрогрессивных фрагмента), содержат значительно более низкий средний уровень вируса ToLCNDV (или титра вируса) в верхних листьях, например, через 15 дпз (дни после заражения), 20 дпз, 25 дпз, 30 дпз и/или 35 дпз (или позже), чем чувствительная контрольная линия или сорт. В настоящем документе термин «значительно более низкий» относится к среднему уровню вируса, определяемому, например, путем кПЦР, который, по меньшей мере, в 1000 раз ниже, более предпочтительно, по меньшей мере, в 5000 раз, или, по меньшей мере, в 10000 раз, или, по меньшей мере, в 50000 раз, или, по меньшей мере, в 100000 раз, или, по меньшей мере, в 1000000 раз, ниже, чем для чувствительной контрольной линии или сорта. Способы количественного определения уровней ToLCNDV описаны, например, в Simon et al. (Журнал «Plant Disease», январь 2018,

том 102, № 1, стр. 165-171). В соответствии с одним аспектом среднее значение Ct (критическое значение цикла) для устойчивой линии растений, по меньшей мере, в 2 раза превышает такое значение для чувствительной линии или сорта, или, по меньшей мере, в 2,5 или в 3,0 раза. В соответствии с одним аспектом среднее значение Ct для устойчивой линии растений составляет, по меньшей мере, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 38, в то время как среднее значение Ct для чувствительной линии или сорта составляет 15 или менее, 14 или менее, например, 13 или менее, 12 или менее, 11 или менее, 10 или менее. Более подробная информация доступна по следующему адресу в Интернете: bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/ и в ссылочных материалах. Значения Ct обратно пропорциональны количеству целевой нуклеиновой кислоты (в данном случае ДНК вируса ToLCNDV), которое находится в образце, и коррелируют с количеством копий в образце. Более низкие значения Ct указывают на высокие количества целевой нуклеиновой кислоты, тогда как более высокие значения Ct означают более низкие количества целевой нуклеиновой кислоты.

В соответствии с одним вариантом реализации семена содержат фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 устойчивого к ToLCNDV донорского растения, при этом фрагмент интрогрессии содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни между SNP_02 и SNP_04 или между SNP_02 и SNP_03 или между SNP_03 и SNP_04.

Еще один вариант реализации настоящего изобретения относится к семенам дыни, которые получают/можно получить из растений по изобретению, или к семенам, содержащим клетки растений по настоящему изобретению.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к плодам дыни, содержащим фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 и/или 12 устойчивого к ToLCNDV донорского растения, при этом такой фрагмент интрогрессии содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни между SNP_01 и SNP_04 или между SNP_01 и SNP_03 или между SNP_01 и SNP_02 или между SNP_02 и SNP_04 или между SNP_02 и SNP_03 или между SNP_03 и SNP_04 для хромосомы 11; и/или при этом такой фрагмент интрогрессии содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни между SNP_05 и SNP_07 или между SNP_05 и SNP_06 или между SNP_06 и SNP_07 для хромосомы 12.

Еще один вариант реализации настоящего изобретения относится к плодам дыни, которые получают/можно получить из растений по изобретению, или к плодам, содержащим клетки растений по настоящему изобретению.

Предпочтительные варианты реализации и прочие варианты реализации, описанные в настоящем документе для растений дыни или клеток растений дыни по изобретению, применимы соответственно к предпочтительным и прочим вариантам реализации, относящимся к плодам растений дыни.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к материалу для размножения дыни, содержащему фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 и/или 12 устойчивого к ToLCNDV донорского растения, при этом такой фрагмент интрогрессии содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни между SNP_01 и SNP_04 или между SNP_01 и SNP_03 или между SNP_01 и SNP_02 или между SNP_02 и SNP_04 или между SNP_02 и SNP_03 или между SNP_03 и SNP_04 для хромосомы 11; и/или при этом такой фрагмент интрогрессии содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни между SNP_05 и SNP_07 или между SNP_05 и SNP_06 или между SNP_06 и SNP_07 для хромосомы 12.

Еще один вариант реализации настоящего изобретения относится к материалу для размножения растений дыни, который получают/можно получить из растений по изобретению, или к материалу для размножения растения дыни, содержащему клетки растений по настоящему изобретению.

Предпочтительные варианты реализации и прочие варианты реализации, описанные в настоящем документе для растений или клеток растений по изобретению, применимы соответственно к предпочтительным и прочим вариантам реализации, относящимся к материалу для размножения растений дыни.

Термин «материал для размножения» включает те компоненты растения, которые пригодны для получения потомства вегетативным (бесполом) или генеративным (половым) путем. Для вегетативного размножения могут использоваться, например, черенки, культуры ткани *in vitro*, клетки, протопласты, зародыши или каллусы, материал для микроклонального размножения, корневища или клубни. Прочий материал для размножения включает, например, плоды, семена, сеянцы, содержащие описанный один или два фрагмента интрогрессии, которые

придают устойчивость к ToLCNDV, и т.д. В соответствии с одним аспектом материал для размножения представляет собой черенки, размножение которых осуществляется путем их прививки к другому корневищу или материалу тканевой культуры *in vitro*, в частности, к зародышевым культурам. Особенно предпочтительным является материал для размножения в виде материала для тканевых культур *in vitro*, в частности, зародышевые культуры *in vitro*.

Еще один вариант реализации изобретения относится к способу получения растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, который включает следующие этапы:

- a) отбор растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV,
- b) скрещивание растения-донора, отобранного на этапе a), с рекуррентным растением, не обладающим устойчивостью к ToLCNDV,
- c) получение семян из растений, полученных путем скрещивания на этапе b), и, при необходимости,
- d) самоопыление выращенного из семян растения один или несколько раз или одно или несколько обратных скрещиваний выращенного из семян растения с рекуррентным растением, чувствительным к ToLCNDV, с получением потомства, и, при необходимости,
- e) проверку того, обладают ли растения, выращенные из семян, полученных на этапе c), устойчивостью к ToLCNDV (и которое из таких растений обладает устойчивостью к ToLCNDV), и/или содержат ли они один или более SNP из растения-донора, которые выбраны из группы SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04; и/или SNP_05, SNP_06 и SNP_07.

При необходимости, способ также включает этап отбора растения, устойчивого к ToLCNDV, содержащего QTL11 и/или QTL12, предпочтительно в гомозиготной форме. При необходимости, для получения гомозиготного растения осуществляется самоопыление растения, содержащего один или более маркеров SNP.

На этапе a) способа получения устойчивого к ToLCNDV растения дыни по изобретению устойчивое к ToLCNDV растение-донор может быть отобрано путем заражения растений дыни ToLCNDV и определения уровня выраженности

симптомов заражения ToLCNDV растения дыни в соответствии с описанием в настоящем документе. В соответствии с одним аспектом донор имеет средний индекс активности заболевания 9,0. При необходимости, донорское растение содержит один или более устойчивых генотипов SNP для одного или более или всех маркеров из SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04 и/или для одного или более SNP из SNP_05, SNP_06 и SNP_07; В соответствии с одним аспектом донор имеет средний индекс активности заболевания 9,0 и содержит устойчивый генотип согласно Таблице 3, по меньшей мере, для SNP_03 и/или SNP_06. В соответствии с еще одним аспектом средний индекс активности заболевания по ToLCNDV для донора составляет 9,0, и донор содержит устойчивый генотип для SNP_02, SNP_03 и SNP_04, при необходимости, также для SNP_01. В соответствии с еще одним аспектом средний индекс активности заболевания по ToLCNDV для донора составляет 9,0, и донор содержит устойчивый генотип SNP для SNP_01, SNP_02, SNP_03, SNP_04, SNP_05 и SNP_06, при необходимости, также для SNP_07. Предпочтительно донор является гомозиготным по генотипу SNP. При необходимости, может осуществляться самоопыления донора для отбора донорского растения, которое является гомозиготным. В соответствии с еще одним аспектом донорское растение содержит ту же последовательность между SNP_01 и SNP_04 и/или между SNP_05 и SNP_06 (при необходимости, между SNP_05 и SNP_07), что и фрагмент, введенный в семена, внесенные в базу под номером доступа NCIMB 42625. Донором может быть дикое растение дыни или дикий родственник дыни. Донором может быть тот же донор, который использовался для введения QTL11 и QTL12 в семена NCIMB 42625. В соответствии с одним аспектом в верхних листьях донорского растения после инфицирования количество частиц вируса ToLCNDV является очень низким (например, среднее значение Ct составляет, по меньшей мере, 30 или более) или не обнаруживаются, например, с использованием кПЦР или дот-блот анализа в соответствии с описанием, например, в разделе «Примеры».

Еще один вариант реализации изобретения относится к способу получения растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, включающему следующие этапы:

- a) отбор устойчивых к ToLCNDV культурного растения дыни, содержащего фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и/или 12, при этом указанная интрогрессия придает устойчивость к ToLCNDV в

соответствии с описанием в настоящем документе,

- b) скрещивание растения дыни, отобранного на этапе а), с другим растением дыни, например, с растением дыни, чувствительным к ToLCNDV, или с растением, не обладающим устойчивостью к ToLCNDV, например, с растением, у которого средний индекс активности заболевания по ToLCNDV составляет 4,0 или менее, предпочтительно менее 4,0 или менее 3,0,
- c) получение семян из растений, полученных путем скрещивания на этапе b), и, при необходимости,
- d) самоопыление выращенного из семян растения один или несколько раз или одно или несколько обратных скрещиваний растения, выращенного из семян, с растением, чувствительным к ToLCNDV, с получением потомства, и, при необходимости,
- e) проверку того, обладают ли растения, выращенные из семян, полученных на этапе c), устойчивостью к ToLCNDV (и которое из таких растений обладает устойчивостью к ToLCNDV), и/или содержат ли они один или более SNP из растения-донора, которые выбраны из группы SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04; и/или SNP_05, SNP_06 и SNP_07.

При необходимости, способ также включает этап отбора растения, устойчивого к ToLCNDV, содержащего QTL11 и/или QTL12, предпочтительно в гомозиготной форме.

На этапе а) способа получения устойчивого к ToLCNDV растения дыни по изобретению устойчивое к ToLCNDV культурное растение может быть отобрано путем заражения растений дыни ToLCNDV и определения уровня выраженности симптомов заражения ToLCNDV растения дыни в соответствии с описанием в настоящем документе. В соответствии с одним аспектом донор средний индекс активности заболевания для культурного растения составляет, по меньшей мере, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 или 9,0. При необходимости, культурное растение содержит один или более устойчивых донорских генотипов SNP для одного или более или всех маркеров из SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04 и/или для одного или более SNP из SNP_05, SNP_06 и, при необходимости, SNP_07; В соответствии с одним аспектом культурное растение представляет собой культурное растение дыни, содержащее

фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и/или 12 в соответствии с описанием в настоящем документе. В соответствии с одним аспектом растение на этапе а) может представлять собой растение, выращенное из семян с номером доступа NCIMB 42625, или потомство такого растения, которое содержит QTL11 и/или QTL12. Таким образом, это может быть растение, которое содержит тот же фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и/или 12 или меньший фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и/или 12 по сравнению с фрагментом интрогрессии во внесенных в базу семенах.

В соответствии с одним аспектом способов получения растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV по настоящему изобретению, устойчивое к ToLCNDV донорское растение или культурное растение дыни на этапе а) содержит фрагмент на хромосомы 11 и/или 12, при этом такой фрагмент содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни между SNP_01 и SNP_04 или между SNP_01 и SNP_03 или между SNP_01 и SNP_02 или между SNP_02 и SNP_04 или между SNP_02 и SNP_03 или между SNP_03 и SNP_04 для хромосомы 11; и/или при этом такой фрагмент содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни между SNP_05 и SNP_07 или между SNP_05 и SNP_06 или между SNP_06 и SNP_07 для хромосомы 12.

В одном из вариантов реализации изобретения способ получения растения, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, по настоящему изобретению используется для получения растения по настоящему изобретению. Предпочтительные варианты реализации и прочие варианты реализации, описанные в настоящем документе для растений по изобретению, применимы соответственно к способу получения растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, по настоящему изобретению.

Растения, которые получают/можно получить способом получения растений дыни, обладающих устойчивостью к ToLCNDV, по настоящему изобретению, также являются вариантом реализации изобретения.

Еще один вариант реализации изобретения относится к способам получения плодов и, при необходимости, семян дыни, включающему следующие этапы:

- а) выращивание растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, содержащего две хромосомы 11, каждая из которых

содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 устойчивого к ToLCNDV донорского растения, при этом фрагмент интрогрессии содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни для SNP_03 или между SNP_03 и SNP_04 или между SNP_02 и SNP_03, или фрагмент интрогрессии содержит генотип устойчивого к ToLCNDV донорского растения для одного SNP или нескольких SNP или всех SNP из SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04;

- b) сбор плодов растений дыни, выращенных на этапе а), и, при необходимости,
- c) сбор семян из плодов, полученных на этапе b).

Растение дыни, полученное на этапе а), представляет собой растение в соответствии с описанием в настоящем документе, содержащее QTL11, как описано выше, в частности, QTL11 присутствует в гомозиготной форме, так что происходит экспрессия фенотипа. При необходимости, растение дыни может также содержать фрагмент интрогрессии на хромосоме 12 также в соответствии с описанием выше. Таким образом, растение, полученное на этапе а), может также содержать одну или две хромосомы 12 с фрагментом интрогрессии на хромосоме 12 устойчивого к ToLCNDV донорского растения, при этом указанный фрагмент интрогрессии содержит последовательность донорского растения для SNP_05 и/или SNP_06 и/или SNP_07 или между SNP_05 и SNP_07 или между SNP_05 и SNP_06 или между SNP_06 и SNP_07.

В соответствии с одним аспектом культурное растение дыни, полученное на этапе а), представляет собой гибридное растение F1, при этом от такого растения получают плоды дыни для коммерческого использования.

В предпочтительном варианте реализации изобретения растения дыни на этапе а) способа получения плодов или семян дыни по изобретению имеют специфические характеристики, описанные в настоящем документе как различные варианты реализации для растений по настоящему изобретению. Различные варианты реализации и прочие варианты реализации, описанные в настоящем документе для растений по изобретению, применимы соответственно к способу получения гибридного семени дыни по настоящему изобретению.

Семена, которые можно получить способом получения семян дыни по настоящему изобретению, также являются вариантом реализации изобретения.

Еще один вариант реализации изобретения относится к способу получения гибридных семян дыни, в частности, семян гибрида F1, который включает следующие этапы:

- a) получение первого инбредного растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, содержащего две хромосомы 11, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 устойчивого к ToLCNDV донорского растения, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL11 и последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни для SNP_03 или между SNP_03 и SNP_04 или между SNP_02 и SNP_03, или фрагмент интрогрессии содержит QTL11 и генотип устойчивого к ToLCNDV донорского растения для одного SNP или нескольких SNP или всех SNP из SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04;
- b) получение второго инбредного растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, содержащего две хромосомы 11, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 устойчивого к ToLCNDV донорского растения, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL11 и последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни для SNP_03 или между SNP_03 и SNP_04 или между SNP_02 и SNP_03, или фрагмент интрогрессии содержит QTL11 и генотип устойчивого к ToLCNDV донорского растения для одного SNP или нескольких SNP или всех SNP из SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04;
- c) скрещивание инбредного растения дыни, полученного на этапе a), с инбредным растением дыни, полученным на этапе b),
- d) сбор семян, полученных в результате скрещивания на этапе c).

В соответствии с одним аспектом инбредное растение на этапе a) или этапе b) обладает мужской стерильностью, таким образом, на этапе c) происходит только перекрестное опыление с получением гибридных семян F1 на этапе d).

При необходимости, инбредное растение на этапе а) или этапе б) дополнительно содержит две хромосомы 12, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии, имеющий QTL12 в соответствии с описанием. Таким образом, в соответствии с одним аспектом растение на этапе а) или этапе б) содержит QTL11 в гомозиготной форме и дополнительно содержит QTL12 в гомозиготной форме. Таким образом, гибридные семена F1 содержат QTL11 в гомозиготной форме и QTL12 в гетерозиготной форме.

В соответствии с еще одним аспектом растение на этапе а) и растение на этапе б) содержат QTL11 в гомозиготной форме и QTL12 в гомозиготной форме. Следовательно, гибридные семена F1 на этапе с) содержат оба QTL в гомозиготной форме.

Одним из вариантов реализации изобретения также являются собранные гибридные семена, в частности, гибридные семена F1. Такими семенами являются семена, которые продают для коммерческого выращивания плодов дыни. Растения, выращенные из этих семян, будут обладать устойчивостью или высокой устойчивостью к ToLCNDV при выращивании в полевых условиях.

В соответствии с еще одним вариантом реализации настоящее изобретение относится к способу получения гибридных семян дыни, в частности, семян гибрида F1, включающему следующие этапы:

- а) получение первого инбредного растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, содержащего две хромосомы 12, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 12 устойчивого к ToLCNDV донорского растения, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL12 и последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни для SNP_06 или между SNP_05 и SNP_07 или между SNP_05 и SNP_06 или между SNP_06 и SNP_07, или фрагмент интрогрессии содержит QTL12 и генотип устойчивого к ToLCNDV донорского растения для одного SNP или нескольких SNP или всех SNP из SNP_05 и SNP_06 и SNP_07;
- б) получение второго инбредного растения дыни;
- с) скрещивание инбредного растения дыни, полученного на этапе а), с инбредным растением дыни, полученным на этапе б),

d) сбор семян, полученных в результате скрещивания на этапе с).

При необходимости, второе инбредное растение дыни, полученное на этапе b), также представляет собой инбредное растение дыни, обладающее устойчивостью к ToLCNDV, содержащее две хромосомы 12, которые содержат фрагмент интрогрессии из хромосомы 12 устойчивого к ToLCNDV донорского растения, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL12 и последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения дыни для SNP_06 или между SNP_05 и SNP_07 или между SNP_05 и SNP_06 или между SNP_06 и SNP_07, или фрагмент интрогрессии содержит QTL12 и генотип устойчивого к ToLCNDV донорского растения для одного SNP или нескольких SNP или всех SNP из SNP_05 и SNP_06 и SNP_07.

В соответствии с одним аспектом инбредное растение на этапе a) или этапе b) обладает мужской стерильностью, таким образом, на этапе с) происходит только перекрестное опыление с получением гибридных семян F1 на этапе d).

Гибридные семена F1, собранные на этапе d), содержат QTL12 в гетерозиготной тлт гомозиготной форме. Поскольку QTL12 является частично доминантным, индекс устойчивости к ToLCNDV будет несколько выше у гомозиготного растения, чем у растения, гетерозиготного по QTL12.

Одним из вариантов реализации изобретения также являются собранные гибридные семена, в частности, гибридные семена F1. Такими семенами являются семена, которые продают для коммерческого выращивания плодов дыни. Растения, выращенные из этих семян, будут обладать устойчивостью к ToLCNDV при выращивании в полевых условиях.

В контексте настоящего изобретения термин «инбредное растение» или «инбредная линия» означает растения, которые были получены путем самоопыления в нескольких поколениях и являются в высокой степени однородными по своей генетической структуре и фенотипическому внешнему виду.

В предпочтительном варианте реализации изобретения инбредные линии на этапах a) и b) способа получения гибридных семян дыни по изобретению имеют специфические характеристики, описанные в настоящем документе как предпочтительные и дополнительные варианты реализации для растений по настоящему изобретению. Предпочтительные варианты реализации и прочие варианты реализации, описанные в настоящем документе для растений по

изобретению, применимы соответственно к способу получения гибридного семени дыни по настоящему изобретению.

Гибридные семена, которые получают/можно получить способом получения гибридных семян дыни по настоящему изобретению, также являются вариантом реализации изобретения.

Еще один вариант реализации настоящего изобретения относится к способу получения плода дыни, который включает следующие этапы:

- a) выращивание гибридного растения F1 в соответствии с описанием выше, т.е. содержащего в геноме QTL11 в гомозиготной форме и/или QTL12 в гетерозиготной или гомозиготной форме, и, при необходимости,
- b) сбор плодов растений, выращенных на этапе a).

Термин «плод» в его ботаническом значении обычно означает структуру, содержащую семя, которая развивается из завязи цветков покрытосеменных.

Плоды дыни, которые получают/можно получить способом получения плодов дыни по настоящему изобретению, также являются вариантом реализации изобретения.

Растения-доноры дыни, устойчивые к ToLCNDV из-за присутствия в их геноме QTL11 и/или QTL12, могут быть идентифицированы с помощью маркеров SNP, в частности, одного или более или всех маркеров из SNP_01, SNP_02, SNP_03, SNP_04 и/или одного или более маркеров из SNP_05, SNP_06 и SNP_07, которые описаны в настоящем документе. Таким образом, настоящим изобретением впервые обеспечивается возможность для специалиста в данной области идентифицировать растения-доноры, из которых фрагмент интрогрессии, придающий устойчивость растениям дыни к ToLCNDV, может быть перенесен в рекуррентные растения дыни.

Аналогичным образом, изобретением впервые предоставляются культурные растения, части растений и клетки растений дыни, содержащие в своем геноме фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и/или 12, который придает устойчивость к ToLCNDV растениям дыни, которые без него являлись бы чувствительными.

Таким образом, еще один вариант реализации изобретения относится к применению одного или более или всех SNP_01, SNP_02, SNP_03, SNP_04 и/или одного или более или всех SNP_05, SNP_06 и SNP_07 для идентификации растения

дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, или его частей (таких как клетки, плоды, листья).

Предпочтительно такое применение относится к идентификации устойчивого к ToLCNDV донорского растения или части растения дыни и/или культурного растения или части растения дыни.

Еще один вариант реализации изобретения относится к применению одного или более или всех маркеров из SNP_01, SNP_02, SNP_03, SNP_04 и/или одного или более маркеров из SNP_05, SNP_06 и SNP_07 для интрогрессии характеристики устойчивости к ToLCNDV в растение дыни, не обладающее устойчивостью к ToLCNDV, в частности, в культурную линию или сорт дыни.

Кроме того, еще один вариант реализации изобретения относится к применению одного или более или всех маркеров из SNP_01, SNP_02, SNP_03, SNP_04 и/или одного или более маркеров из SNP_05, SNP_06 и SNP_07 для выведения растений дыни, обладающих устойчивостью к ToLCNDV.

Также предоставляется способ скрининга (или селекции) растений или частей растений (таких как ткань, клетки растения и т.д.) или полученных из них ДНК на наличие фрагмента на хромосоме 11 и/или 12, придающего устойчивость к ToLCNDV. Данный способ включает следующие этапы:

- i) скрининг геномной ДНК на генотип SNP одного или более или всех маркеров из SNP_01, SNP_02, SNP_03, SNP_04 и/или одного или более маркеров из SNP_05, SNP_06 и SNP_07;
- ii) и, при необходимости, отбор растений или частей растений, которые содержат устойчивый донорный генотип одного или более или всех маркеров из SNP_01, SNP_02, SNP_03, SNP_04 и/или одного или более маркеров из SNP_05, SNP_06 и SNP_07;

Такой скрининг может осуществляться с использованием различных методов, например, могут использоваться различные виды анализа генотипирования SNP (например, анализ KASP, анализ TaqMan SNP, высокоразрешающее плавление (HRM), чипы SNP-генотипирования (например, Fluidigm, Illumina и т.д.) или секвенирование ДНК).

Как ясно из описания, скрининг растений, частей растений или их геномной ДНК может использоваться для различных целей, например, для идентификации устойчивых к ToLCNDV доноров, или как часть программы селекции, например, для идентификации и/или отбора растений или частей растения, содержащих QTL11 и/или QTL12, или для проверки того, используется ли конкурентами настоящее изобретение и производят ли конкуренты инбредные линии или гибриды, содержащие QTL11 и/или QTL12.

Также предоставляется способ выращивания растений по изобретению, например, в районах, где происходит заражение вирусом ToLCNDV, при этом такой способ включает посев семян или посадку саженцев на посевную площадь (например, на поле или в защищенную среду, такую как теплица или пленочный туннель) и, возможно, сбор плодов.

Клетки или ткани, содержащие фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и/или 12 в соответствии с описанием в настоящем документе, могут состоять из неразмножающихся или нерегенерируемых клеток или тканей (содержать неразмножающиеся или нерегенерируемые клетки или ткани) или, в качестве альтернативы, из размножающихся или регенерируемых клеток или тканей (содержать размножающиеся или регенерируемые клетки или ткани). Они могут содержать фотосинтетические или нефотосинтетические клетки или состоять из фотосинтетических или нефотосинтетических клеток. Вегетативные части растений, клетки и ткани, такие как собранные плоды или части мякоти плода, являются нефотосинтетическими частями и тканями. Клетки и ткани могут находиться в виде клеточной или тканевой культуры.

В объем настоящего изобретения также включены собранные плоды или обработанные плоды, например, мякоть плодов дыни в нарезанном виде, например, в контейнере.

В соответствии с одним аспектом растения, части растения и клетки растения по настоящему изобретению получены не только посредством биологического процесса в соответствии с определением в правиле 28(2) ЕПС (Европейской патентной конвенции).

В соответствии с одним аспектом растения не являются ГМО (не являются генетически модифицированными).

QTL11 по настоящему изобретению не является QTL, описанным в документе WO2017/114848, поскольку предусматривается другое положение на хромосоме 11. Это очевидно при проведении BLAST-анализа последовательностей маркеров SNP1–SNP16 относительно генома CM3.6.1 дыни. Наиболее тесно связанными маркерами являются Melon_sbg_33761_74 (SEQ ID NO: 7), Melon_sbg_2720_78 (SEQ ID NO: 8) и Melon_sbg_14207_58 (SEQ ID NO: 9), которые расположены у 33,18 Мб, 33,34 Мб и 33,35 Мб хромосомы. Напротив, наиболее близко связанный маркер QTL11 по настоящему изобретению, SNP_03, расположен у 32,49 Мб. Это положение находится дальше на хромосоме 11, в области их маркера Melon_sbg_55680_17 (SEQ ID NO: 5), расположенного у 32,3 Мб, и Melon_sbg_60684_74 (SEQ ID NO: 6), расположенного у 32,6 Мб. Тем не менее, в RIL-30 фрагмент интрогрессии не присутствует в области, соответствующей Melon_sbg_617_42 (SEQ ID NO: 1) – Melon_sbg_33761_74 (SEQ ID NO: 7), при этом эта линия все еще обладает устойчивостью к ToLCNDV и все еще содержит их QTL11. Нуклеотидная последовательность их интрогрессий также будет полностью отличаться от нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению, поскольку донором является образец *Cucumis melo* подвид *agrestis* *copm acidulous*, тогда как донором по настоящему изобретению является образец *Cucumis melo* подвид *melo*. *Cucumis melo* подвид *agrestis* филогенетически находится в кластере отдельном от *Cucumis melo* подвид *melo*, см., например, дополнительную Фиг. S3 в Gur et al. “Genome-Wide Linkage-Disequilibrium Mapping to the Candidate Gene Level in Melon (*Cucumis melo*)”, Scientific Reports, том 7, номер статьи: 9770 (2017), doi:10.1038/s41598-017-09987-4.

Информация о внесении семян в базу данных

Репрезентативный образец семян культурной дыни, именуемый *Cucumis melo* TOLCHR11-12, содержащий два фрагмента интрогрессии в гомозиготной форме (один, придающий устойчивость к TolCNDV, интрогрессирован на хромосоме 11, а другой, придающий устойчивость к TolCNDV, интрогрессирован на хромосоме 12), был внесен в базу компанией Nunhems B.V. 10 августа 2016 года в NCIMB Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn Aberdeen, Scotland AB21 9YA, UK), согласно Будапештскому договору, на основании экспертного решения (EPC 2000, Правило 32(1)). Семенам были присвоены следующие депозитные номера: NCIMB 42625.

По требованию заявителя образцы биологического материала и любого материала, полученного из него, могут передаваться лишь уполномоченному эксперту в соответствии с Правилom 32(1) EPC или в соответствии с применимым государственным законодательством или договорами, в которых содержатся аналогичные положения и нормы, до указания о выдаче патента, или до момента истечения 20 лет с даты подачи заявления, если заявка была отклонена, отозвана или считалась отозванной.

В течение периода рассмотрения настоящей заявки доступ к внесенным в базу данных образцам будет предоставляться лицами, определяемым уполномоченным директором Патентного ведомства США, по запросу. С учетом положений Раздела 37 Свода Федеральных Правил США, § 1.808(b), любые ограничения, накладываемые вносящим лицом в отношении внесенного в базу данных материала, после предоставления патента в безотзывном порядке снимаются. Внесенный в базу данных материал сохраняется в течение 30 лет или в течение 5 лет со дня последнего запроса или в течение срока действия патента, в зависимости от того, какой из указанных сроков заканчивается позже; если в течение этого периода вирус станет нежизнеспособным, материал подлежит замене. Заявитель не отказывается от каких-либо прав, предоставляемых в соответствии с этим патентом по настоящей заявке или в соответствии с Законом о защите прав селекционеров (Раздел 7 Свода законов США 2321, и далее).

Описание последовательностей

Символы, отличные от G (гуанин), A (аденин), T (тимин) и C (цитозин), в последовательностях, приведенных в перечне последовательностей, имеют следующие значения:

R: G или A

Y: T или C

M: A или C

K: G или T

S: G или C

W: A или T

H: A или C или T

B: G или T или C

V: G или C или A

D: G или A или T

N: G или A или T или C

SEQ ID NO 1: Последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения, содержащая SNP_01.

SEQ ID NO 2: Последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения, содержащая SNP_02.

SEQ ID NO 3: Последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения, содержащая SNP_03.

SEQ ID NO 4: Последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения, содержащая SNP_04.

SEQ ID NO 5: Последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения, содержащая SNP_05.

SEQ ID NO 6: Последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения, содержащая SNP_06.

SEQ ID NO 7: Последовательность устойчивого к ToLCNDV донорского растения, содержащая SNP_07.

SEQ ID NO 8 - 10: SNP_01 FAM аллельный праймер, SNP_01 VIC аллельный праймер, SNP_01 обычный праймер

SEQ ID NO 11-13: SNP_02 FAM аллельный праймер, SNP_02 VIC аллельный праймер, SNP_02 обычный праймер

SEQ ID NO 14 - 16: SNP_03 FAM аллельный праймер, SNP_03 VIC аллельный праймер, SNP_03 обычный праймер

SEQ ID NO 17 - 19: SNP_04 FAM аллельный праймер, SNP_04 VIC аллельный праймер, SNP_04 обычный праймер

SEQ ID NO 20 - 22: SNP_05 FAM аллельный праймер, SNP_05 VIC аллельный праймер, SNP_05 обычный праймер

SEQ ID NO 23 - 25: SNP_06 FAM аллельный праймер, SNP_06 VIC аллельный праймер, SNP_06 обычный праймер

SEQ ID NO 26 - 28: SNP_07 FAM аллельный праймер, SNP_07 VIC аллельный праймер, SNP_07 обычный праймер

SEQ ID NO: 1

gctaataaac	tcgggttttg	aaacgctcag	aggattatcg	ttaccggaaa	catgaacgga
agtccatgtt	ttgacaaacg	aactaatgga	cgacgcgtcg	aaaatcttgt	gcgacatgag
taagccaaca	gtaatgcctc	cacattgaaa	cgctcgtggtt	tggatgagta	caatacatcc
tttgtagcgc	agatgaaaag	g			

SEQ ID NO: 2

gtttgttttg	atcaaaaaaa	tcaaacattt	aagtaaataa	tatactacat	taaattgtgta
agtgagtcta	gcagtataca	ttccgtcgat	gtactaaact	gaattcaaaag	agtttatgca
tataagtga	tgaatatccc	aaaacttatc	aatttcagaa	gaagagaaaa	aactaggttt
ccttatcctt	tttgtgagcc	a			

SEQ ID NO:3

ctcgtagagc	at ttgaacgc	cacagtggaa	ctggccgtgg	gtaagtgtct	gctgtctggt
cttttaaatt	ttgttggtga	cactcctgct	gcatattcta	tgccattttg	acacttcatt
cctgatttta	tgcttagaaa	tgaatttaaa	cgagaagggt	ctggtcgtgg	aaattgggga
aggtcaactg	acgaatttgc	t			

SEQ ID NO:4

tctctctggt	ggataactca	tgtaatggtc	ttgtctttat	ttgtaagtgt	gcttttttta
ctcgttgtga	tgccatattc	aatcctatga	ctaatagagt	tttccaaatt	cctcgagggtg
aattagatgg	tgatattttac	tcctacgaat	taggttttag	ccctacaaca	aagcaatata
aattgtttcg	agttaccgaa	t			

SEQ ID NO:5

atacaaccca	tcaaccaaaa	tcttccaact	aattatagag	actttgataa	aaggaaaaaa
aagagtaaca	aatagcgatg	cgaggaaagg	gacgatggcc	cgtacatatt	agcatgctca
taaacaaatt	caaaaagccc	aacaaagacg	aagaaaaata	acgaaaacca	tgatggcaca
aagcattgtc	aagtctcgga	a			

SEQ ID NO:6

tgacaacagc	tttcaccacc	aatcaataaa	atgaggatgg	attcaagatt	tatgccaaaca
ccctgatccc	aaattgaaga	tgccaaacaa	agggacacag	gaatcattgt	ctaagaaatt
gtaaaaaccc	cacaatgaaa	acttctatca	aagacacggg	aatctacagt	ttgtacagtc
acttgcacaa	gcattcttcaa	a			

SEQ ID NO:7

atcgttataa	agtcgtcaat	ggcatgacgc	acaatcgggtc	cttcaaccat	tgtaaaacca
acgtcgaaatt	tgcataacgt	gtcgtcctca	acatgattag	tgacacgata	agcgacaaaa
atttcgggaa	aatttagttg	ttgatcctca	acatcgtcca	cttcgggtac	gtttcatata
cgtttatatt	ggacaacctt	a			

Описание Фигур

Фиг. 1: Показаны средние уровни выраженности симптомов (для трех параллельных опытов) через 35 дней после заражения (дпз) ToLCNDV путем передачи от белокрылки у линии растения-донора, устойчивого к ToLCNDV (дикий донор), линии рекуррентного растения (рекуррентное растение) и линии растения NCIMB 42625. Средние уровни выраженности симптомов определяли в соответствии с описанием в настоящем документе, в разделе «Общие методы».

Общие методы

1. Определение уровня выраженности симптомов у растений, инфицированных ToLCNDV

1.1 Растения и патогены (вирус)

Для заражения растений дыни используется штамм ToLCNDV, инфицирующий растения дыни (*Cucumis melo*). В настоящем изобретении в качестве инокулята использовали штамм ToLCNDV, выделенный в Мурсии, Испания.

1.2 Инокулят ToLCNDV

Источник инокулята ToLCNDV сохранялся на живых зараженных растениях дыни. Необходимо убедиться, что используют чистые изоляты вируса и что ни источник вируса, а также белокрылки не заражены другими заболеваниями, в частности другими вирусами (например, CGMMV, CYSDV, CYVY SqMV). Для предварительного размножения инокулята ToLCNDV белокрылок (*Bemisia tabaci*) кормили чувствительными (восприимчивыми) к ToLCNDV зараженными растениями дыни в клетке для содержания насекомых. Перед заражением исследуемых растений инфицированные ToLCNDV растения помещали в клетку для содержания насекомых, белокрылок помещали в ту же клетку и позволяли им питаться зараженными ToLCNDV растениями в течение примерно 3 дней.

1.3 Инокуляция исследуемых растений

Для каждого анализируемого генотипа растений дыни выращивали 14 растений до тех пор, пока не распустился первый настоящий лист (как правило, через 12 - 15 дней после посева), 12 из которых были инфицированы, а 2 растения ложно инфицированы. Также были включены 12 растений восприимчивых сортов, в этом эксперименте – сорт Gandalf F1 (Hild Samen) и сорт Vedantrais. 12 растений для каждого генотипа, которые должны быть исследованы на устойчивость к ToLCNDV, поместили в клетку для содержания насекомых, затем в клетку для содержания насекомых помещали зараженных белокрылок в соответствии с описанием в пункте 1.2 выше. Необходимо убедиться, что на каждое исследуемое растение в клетке было, по меньшей мере, по 5 - 10 белокрылок. Белокрылки и исследуемые растения сохраняют в клетке в течение приблизительно 48 часов, затем белокрылок уничтожают соответствующим инсектицидом. Также два растения на генотип были ложно инфицированы, то есть их содержали в тех же условиях, что и исследуемые растения, за исключением того, что белокрылки, используемые для заражения, не были инфицированы ToLCNDV.

1.4 Выращивание инфицированных исследуемых растений

Инфицированные исследуемые растения, полученные в соответствии с описанием в п. 1.3, пересадили в горшки большего размера и перенесли в теплицу с охлаждающим оборудованием. Растения выращивали при температуре приблизительно 18 °C ночью и приблизительно 25 °C днем со световым периодом

14 - 16 ч. Инфицированные растения для каждого инфицированного генотипа выращивали в двух повторных опытах на двух разных участках, на каждом из которых было размещено 6 растений, инфицированных ToLCNDV и одно ложно инфицированное растение. Участки были рандомизированы в отношении площади выращивания.

1.5. Оценка уровня выраженности симптомов инфекции ToLCNDV

Оценка уровня выраженности симптомов может осуществляться уже приблизительно через 15 дней после заражения (дпз) ToLCNDV, но предпочтительно производится приблизительно через 30 дней после заражения (дпз) ToLCNDV или позже, например, через 35 дпз. В случае, если имеются растения, демонстрирующие выздоровление от вирусной инфекции, дальнейшая оценка симптомов может, при необходимости, проводиться приблизительно через 45 дней после заражения (дпз) ToLCNDV.

Используют следующие уровни выраженности симптомов в соответствии с фенотипами, указанными ниже:

Уровень выраженности
симптомов

Наблюдаемый фенотип

1	Мертвое растение
2	Чрезвычайно сильная мозаичность и свертывание листа, хлороз и снижение роста. Растение не может выздороветь.
3	Сильная мозаичность и свертывание листа, хлороз и снижение роста. Растение не может выздороветь.
4	Свертывание и мозаичность, хлороз, наблюдается незначительное снижение роста, или снижение роста не наблюдается. Растение не может выздороветь.
5	Свертывание и мозаичность, хлороз, снижение роста не наблюдается. Наблюдается незначительное выздоравливание верхней части растения
6	Незначительное свертывание, мозаичность и хлороз, снижение роста не наблюдается. Наблюдается

	выздоровливание верхней и средней части растения
7	Незначительное свертывание, мозаичность и хлороз, снижение роста не наблюдается. Симптомы наблюдаются лишь в нижней части растения
8	Слабая мозаичность
9	Отсутствие симптомов

1.6 Дополнительные исследования, проводимые при необходимости

Рекомендуется использовать, по крайней мере, один генотип с высокой степенью устойчивости к ToLCNDV (например, с уровнем симптомов 8 - 9) и один генотип с высокой степенью чувствительности к ToLCNDV (например, уровень симптомов 1 или 2) в качестве контрольных растений в каждой экспериментальной модели. Кроме того, в каждую экспериментальную модель рекомендуется также включать генотип, являющийся промежуточно устойчивым к инфекции ToLCNDV. Когда эти контрольные генотипы показывают ожидаемый уровень симптомов, это четко указывает на то, что экспериментальные условия могут использоваться для оценки тестируемых растений. Особенно важно включить чувствительную контрольную линию или сорт, которые демонстрируют ожидаемые симптомы во время оценки, например, через 30 дпз или позже (например, через 35 дпз).

Кроме того, рекомендуется осуществлять проверку инфицирования и распространения ToLCNDV на зараженных и контрольных растениях. Это может быть сделано путем проверки наличия и/или количества вирусной ДНК в верхних частях растений. Подходящим способом проверки наличия и/или количества ДНК ToLCNDV в верхних частях растения является гибридизация растительного материала с помощью зонда, гибридизующегося с ДНК используемого штамма ToLCNDV. Различные техники гибридизации хорошо известны специалистам. Для получения ценных результатов достаточно несложного, так называемого точечного анализа. Дополнительно или в качестве альтернативы может применяться qPCR.

1. Отбор растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV

Проводили исследование уровня выраженности симптомов для диких образцов дыни проверяли на устойчивость к ToLCNDV в соответствии с исследованием, описанным в разделе «Общие методы». Было идентифицировано

дикое растение-донор, обладающее высокой устойчивостью к ToLCNDV и имеющее средний уровень устойчивости 9 (симптомы отсутствуют) через 15 дпз, 25 дпз и 35 дпз, в то время как восприимчивое растение имело средний индекс активности заболевания 2,8 через 15 дпз, 2,0 дпз через 25 дпз и 2,0 через 35 дпз.

Также, через 30 дпз для зараженных донорских растений и чувствительной контрольной линии осуществляли блот-гибридизацию и кПЦР (количественную ПЦР). Через 30 дпз в ткани донора вирус ToLCNDV не был обнаружен, а в чувствительных контрольных растениях ToLCNDV обнаруживался. (Обратите внимание, что низкое значение Ct означает высокий титр вируса, а высокое значение Ct означает небольшое количество вируса)

	Сигнал дот-блот анализа	кПЦР – среднее значение Ct	нг/мкл
Донорская линия	-	33.8	3.76E-07
Линия, не обладающая устойчивостью	+	13.1	0.19

Отрицательный контроль кПЦР Ct =34

Также проводили еще одну кПЦР в реальном времени с использованием протокола, описанного в работе Simon et al., 2018 г. (см. выше). Вкратце, для кПЦР использовали праймеры и зонды ToLA-up (прямой праймер), ToLA-Low (обратный праймер) и ToLA-Probe (зонд TaqMan) согласно Таблице 1 в работе Simon et al, 2018 г. (см. выше) в соответствии с описанием при следующих условиях термоциклирования: инкубация при 95 °C в течение 2 мин. с последующими 40 циклами при 95 °C в течение 15 сек. и 60 °C в течение 1 мин.

Производили посев растений донора и чувствительного сорта Vedantrais и инокуляция ToLCNDV в соответствии с описанием в настоящем документе выше. Осуществляли три повторных опыта для шести растений на генотип, в каждом повторном опыте использовали три ложно инокулированных растения Vedantrais. Фенотипическую оценку каждого растения осуществляли через 15 дпз, 30 дпз и 45 дпз. От каждого растения через 60 дпз были отобраны образцы для кПЦР.

Генотип	Средний индекс активности заболевания ToLCNDV	CO	Среднее значение Ct (60 дпз)	CO
Донорская линия	9.0	0.0	30.59	3.12
Линия, не обладающая устойчивостью (Vedantrais)	2.75	0.49	10.07	1.32
Ложно инокулированная линия, не обладающая устойчивостью (Vedantrais)	9.0	0.0	39.97	0.42

CO = среднее отклонение

Результаты подтвердили, что донорская линия без симптомов имела чрезвычайно низкие уровни вируса ToLCNDV в листьях через 60 дпз.

2. Идентификация геномного местоположения устойчивости к ToLCNDV

Были разработаны три популяции картирования с использованием донорного растения, полученного в Примере 1, для картирования положения локусов, придающих устойчивость к ToLCNDV (QTL). Фенотипирование популяций картирования проводили в соответствии с описанием выше с использованием шкалы активности ToLCNDV от 1 до 9. Генотипирование первоначально осуществляли с использованием 192 маркеров SNP, а затем использовали дополнительные маркеры SNP для насыщения областей QTL.

Анализ в этих картографических популяциях выявил два основных QTL, связанных с устойчивостью, которые расположены на хромосоме 11 и 12.

Из устойчивого материала авторами изобретения были разработаны линии обратного скрещивания для точного картирования и дальнейшего исследования устойчивости, полученной от донора.

Маркеры, идентифицированные во время точного картирования, и их соответствующие положения в соответствии с общеизвестными данными из работы Diaz et al. (2015, Mol Breeding 35, 188) представлены в Таблице 2 (в описании).

3. Разработка KASP-анализов

Для выявления SNP, связанных с QTL11 (SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04) и QTL12 (SNP_05, SNP_06 и SNP_07), был разработан KASP-анализ. SNP, связанные с QTL11 и QTL12, могут быть определены с использованием следующих праймеров в KASP-анализе:

SNP	FAM аллель	VIC аллель	Общий праймер
SNP_01	SEQ ID NO 8	SEQ ID NO 9	SEQ ID NO 10
SNP_02	SEQ ID NO 11	SEQ ID NO 12	SEQ ID NO 13
SNP_03	SEQ ID NO 14	SEQ ID NO 15	SEQ ID NO 16
SNP_04	SEQ ID NO 17	SEQ ID NO 18	SEQ ID NO 19
SNP_05	SEQ ID NO 20	SEQ ID NO 21	SEQ ID NO 21
SNP_06	SEQ ID NO 23	SEQ ID NO 24	SEQ ID NO 25
SNP_07	SEQ ID NO 26	SEQ ID NO 27	SEQ ID NO 28

4. Интрогрессия ToLCNDV в культурное растение дыни

Обратное скрещивание осуществляли с помощью рекуррентной родительской элитной линии скрещивания типа Piel de Sapo для получения линии, включающей как QTL11, так и QTL12 в гомозиготной форме.

Семена линия интрогрессии, содержащие как QTL11, так и QTL12 в гомозиготной форме были внесены в базу под номером NCIMB 42625 Донорский генотип присутствуют для SNP_01 – SNP_04 и для SNP_05 – SNP_07, проверку этого осуществляли с использованием KASP-анализа.

На Фиг. 1 и в Таблице ниже показано, что донорская и внесенная в базу линия интрогрессии имеют средний индекс активности заболевания 9,0 при оценке через 35 дпз, в то время как чувствительная рекуррентная родительская линия имеет средний индекс активности заболевания 2,4 через 35 дпз.

	СЗДИГ	СО
Дикий донор	9.0	0.0
Рекуррентное (чувствительное) родительское растение	2.4	0.43
NCIMB 42625 (растение дыни, содержащее фрагмент интрогрессии на хр. 11 и хр. 12)	9.0	0.0

СЗДИГ: среднее значение для исследуемого генотипа, СО: среднее отклонение

С донором осуществляли дополнительное обратное скрещивание для интрогрессии одного QTL или обоих QTL в элитные растения-предшественники Галии, Канталупа и Шаранта.

Формула изобретения

1. Культурное растение дыни или клетка растения, содержащие фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 и на хромосоме 12 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, причем фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 содержит последовательность растения-донора дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, между SNP_01 в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 1 и SNP_04 в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 4, и причем фрагмент интрогрессии на хромосоме 12 содержит последовательность растения-донора дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, между SNP_05 в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 5 и SNP_07 в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 7.

2. Культурное растение дыни или клетка растения по п. 1, причем фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 содержит последовательность растения-донора дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV для SNP_03, и причем фрагмент интрогрессии на хромосоме 12 содержит последовательность растения-донора дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV для SNP_06.

3. Культурное растение дыни или клетка растения, содержащие фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 и на хромосоме 12 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, причем фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 содержит аденин в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 1 или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и/или гуанин в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 2 или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и/или тимин в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 3 или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 и/или тимин в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 4 или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, и причем фрагмент интрогрессии на хромосоме 12 содержит цитозин в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 5 или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 и/или гуанин в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 6 или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичности

последовательности с SEQ ID NO: 6, и/или тимин в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 7 или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7.

4. Культурное растение дыни или клетка растения по любому из предшествующих пунктов, причем фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 присутствует в гомозиготной форме, и причем фрагмент интрогрессии на хромосоме 12 присутствует в гомозиготной форме или гетерозиготной форме.

5. Культурное растение или клетка растения дыни по любому из предшествующих пунктов, причем фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 и на хромосоме 12 получен из дикой дыни или из дикого родственника дыни, при необходимости, из того же образца донора дикой дыни или дикого родственника дыни.

6. Культурное растение дыни или клетка растения по любому из предшествующих пунктов, причем фрагмент интрогрессии на хромосоме 11 содержит рецессивный QTL, который придает устойчивость к TolCNDV со средним индексом устойчивости, по меньшей мере, 7 по шкале от 1 (смерть растения) до 9 (симптомы отсутствуют), когда QTL присутствует в гомозиготной форме, причем фрагмент интрогрессии на хромосоме 12 содержит частично доминантный QTL, который придает устойчивость к TolCNDV со средним индексом устойчивости, по меньшей мере, 5, когда QTL присутствует в гомозиготной или гетерозиготной форме.

7. Культурное растение дыни или клетка растения по любому из предшествующих пунктов, причем растение или клетка растения представляет собой инбредное растение или клетку инбредного растения, или гибридное растение F1 или клетку гибридного растения F1.

8. Семя, которое вырастает в растение по любому из пп. 1 - 7.

9. Плод или часть плода культурной дыни, содержащие клетки растения по любому из пп. 1 - 7.

10. Материал для размножения культурного растения дыни, содержащий клетку культурного растения дыни по одному из пп. 1 - 7.

11. Применение инбредной линии по п. 7 в качестве родительского растения для получения семени гибридного растения F1.

12. Способ получения гибридных семян культурной дыни, включающий следующие этапы:

- a) получение первого инбредного растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, содержащего две хромосомы 11, каждая из которых имеет фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL11 и последовательность растения-донора для SNP_03, или между SNP_03 и SNP_04, или между SNP_02 и SNP_03; или фрагмент интрогрессии содержит QTL11 и устойчивый донорный генотип для одного или более, или всех из SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04;
- b) получение второго инбредного растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, содержащего две хромосомы 11, каждая из которых имеет фрагмент интрогрессии из хромосомы 11 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL11 и последовательность растения-донора для SNP_03, или между SNP_03 и SNP_04, или между SNP_02 и SNP_03; или фрагмент интрогрессии содержит QTL11 и устойчивый донорный генотип для одного или более, или всех из SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04;
- c) скрещивание инбредного растения дыни, полученного на этапе a), с инбредным растением дыни, полученным на этапе b); и,
- d) сбор семян, полученных в результате скрещивания на этапе c).

13. Применение одного или более маркеров SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04 и/или одного или более маркеров SNP_05, SNP_06 и SNP_07 для идентификации растения дыни или части растения, или клетки растения, обладающих устойчивостью к ToLCNDV.

14. Применение одного или более маркеров SNP_01, SNP_02, SNP_03 и SNP_04 и/или одного или более маркеров SNP_05, SNP_06 и SNP_07 для

интрогрессии устойчивости к ToLCNDV в культурное растение дыни, восприимчивое к ToLCNDV.

15. Способ скрининга растений или частей растения, или полученных из них ДНК на наличие фрагмента на хромосоме 11 и/или 12, придающего устойчивость к ToLCNDV, включающий следующие этапы:

- i) скрининг геномной ДНК на генотип SNP одного или более или всех маркеров из SNP_01, SNP_02, SNP_03, SNP_04, и/или одного или более маркеров из SNP_05, SNP_06 и SNP_07;
- ii) и, при необходимости, отбор растения или части растения, которые содержат устойчивый донорный генотип одного или более или всех маркеров из SNP_01, SNP_02, SNP_03, SNP_04, и/или одного или более маркеров из SNP_05, SNP_06 и SNP_07.

Фигура 1

