

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090509 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.20

(22) Дата подачи заявки
2018.07.20

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

(54) РАСТЕНИЯ CITRULLUS, ОБЛАДАЮЩИЕ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К CGMMV

(31) 17186574.4

(32) 2017.08.17

(33) EP

(86) PCT/EP2018/069714

(87) WO 2019/034364 2019.02.21

(71) Заявитель:
НУНХЕМС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Сирицотти Альберто (IT), Белон
Донья Даниель (ES), Берентсен
Рихард Бернард (NL), Именес
Фернандес Даниель (ES)

(74) Представитель:
Беляева Е.Н. (BY)

(57) Настоящее изобретение относится к культурным растениям арбуза, обладающим устойчивостью к CGMMV вследствие интрогрессии QTL из растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, вида *Citrullus colocynthis*.

A1

202090509

202090509

A1

Растения *Citrullus*, обладающие устойчивостью к CGMMV

Настоящее изобретение относится к растениям и клеткам растений рода *Citrullus*, растениям и клеткам растений *Citrullus colocynthis* и *Citrullus colocynthis*, обладающим устойчивостью к вирусу CGMMV (вирусу зеленой крапчатой мозаики огурца), к привитым растениям, которые включают прививочные черенки или подвои *Citrullus* и которые обладают устойчивостью к CGMMV, а также к способам получения указанных растений и к применению указанных растений и клеток растений. Кроме того, настоящее изобретение также включает способы борьбы с потерями урожая, вызванными CGMMV, и способы получения семян, обладающих устойчивостью к CGMMV.

Впервые CGMMV (вирус зеленой крапчатой мозаики огурца) был описан в 1953 году, в Великобритании (Ainswoth), при этом вирусом были поражены растения огурца (*Cucumis sativus*). Впоследствии случаи заболевания, вызванного вирусом, также были зарегистрированы в нескольких странах Азии и Европы, например, в Китае, Израиле, Греции, Японии, Индии, Корее, Нидерландах, Пакистане, Польше, России, Саудовской Аравии, Испании, Тайване и Украине. CGMMV – один из немногих вирусов растений, случаи заражения которым были зарегистрированы в Антарктике. (Mandal et al., 2008, Plant Viruses 2(1), 25-34).

Случаи заражения CGMMV были описаны в США, в 2014 году, в области производства семян дыни (ASTA education pamphlet, 2014, A Seed Production and Commercial Growers Guide (обучающая брошюра ASTA, 2014, Фермерское руководство по выращиванию семян)), в Австралии в 2013 году, на предприятиях по выращиванию арбуза (Australian Government, 2016, Draft Pest risk analysis for Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) (бюллетень правительства Австралии, 2016 г., «Предварительный анализ фитосанитарного риска, связанного с вирусом зеленой крапчатой мозаики огурца (CGMMV)») и в Канаде, на предприятиях по тепличному выращиванию корнишонов (Ling & Li, 2014, apsjournals.apsnet.org/doi-abs-10.1094-PDIS-09-13-0996-PDN).

CGMMV представляет собой вид вируса, содержащего плюс-цепь РНК, который относится к роду Tobamovirus и который образует эволюционную кладу, отдельную и отличную от других видов тобамовируса, которые заражают тыквенные культуры. Ближайшими родственниками CGMMV являются другие

тобамовирусы, которые заражают тыквенные культуры, KGMMV, CFMMV и ZGMMV. В полной геномной последовательности CGMMV имеет 59,1 - 60,4% идентичности с другими тобамовирусами, которые заражают тыквенные культуры, и лишь 46,0 - 49,3% с остальными видами тобамовируса. (Mandal et al., 2008, Plant Viruses 2(1), 25-34).

CGMMV имеет узкий круг хозяев, который ограничен, в основном, видами семейств *Cucurbitaceae* и *Chenopodiaceae*. Тем не менее, некоторые изоляты инфицируют несколько видов *Solanaceae*. Природный круг хозяев CGMMV включает следующие виды: *Cucumis sativus*, *Cucumis anguria*, *Cucumis melo*, *Citrullus lanatus* и *Lagenaria siceraria*. В Антарктиде были зарегистрированы случаи, когда CGMMV имел необычных хозяев – мхи (*Barbilophozia* и *Polytrichum*) и луговик антарктический (*Deschampsia antarctica*). Экспериментальный круг хозяев CGMMV включает следующие виды растений: *Chenopodium amaranticolor*, *Citrullus lanatus*, *Cucumis sativus*, *Cucumis melo*, *Cucumis melo* var. *utilissima*, *Cucurbita pepo*, *Cucumis moschata*, *Datura stramonium*, *Lagenaria siceraria*, *Luffa acutangula*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana debneyii* и *Trichosanthes anguina*. *Momordica charantia* и *Nicotiana tabacum* являются бессимптомными хозяевами. У большинства видов-хозяев развиваются системные симптомы, а у некоторых хозяев (*C. amaranticolor* и *Datura stramonium*) развиваются локальные симптомы поражения. (Mandal et al., 2008, Plant Viruses 2(1), 25-34).

Типичные симптомы заболевания, вызванные CGMMV, представляют собой системную зеленоватую пятнистую мозаику на листе, однако, симптоматика может варьироваться в зависимости от определенного изолята/штамма и от того, какие виды растений поражены заболеванием. У привитых растений арбуза CGMMV вызывает заболевание «сырого мяса» (blood flesh disease) в Кореи (Lee et al. 1990), болезнь «конняку» в Японии и аналогичное заболевание в Греции. (Mandal et al., 2008, Plant Viruses 2(1), 25-34).

Арбуз (*Citrullus lanatus* ssp *vulgaris*), зараженный CGMMV, может давать внешне полностью здоровые плоды, однако, с мякотью ухудшенного качества внутри, которые поэтому не пригодны для употребления в пищу и, следовательно, не обладают рыночной ценностью (Hongyun et al., 2008, J. Virological Methods 149, 326-329).

Одним из ключевых процессов вирусного патогенеза является системное движение в инфицированных растениях-хозяевах. Движение вируса в растении происходит в два основных этапа: перемещение на короткие расстояния от клетки к клетке через плазмодесматы и перемещение на большие расстояния через сосудистые ткани. Движение CGMMV на большие расстояния происходит от донора фотоассимилята к акцептору, который поддерживает механизмы транспорта по флоэме. В системно зараженных листьях (акцепторах) CGMMV одновременно обнаруживается в ксилеме и флоэме. Высокие уровни CGMMV накапливаются в дифференцирующих трахеидах молодых листьев. (Mandal et al., 2008, Plant Viruses 2(1), 25-34).

В природе распространение CGMMV происходит в основном через контакт с зараженными растительными материалами. Заражение растений CGMMV происходит путем передачи через почву и поливную воду, загрязненную зараженным растительным мусором. Вначале зараженный растительный мусор, вероятно, является основным источником инфекции для малого числа растений, а затем вирус постепенно распространяется при контакте растений. При выращивании арбуза CGMMV является опасным вирусом, который передается семенами и прививочным материалом (подвой или черенок). Для тыквы бутылочной и огурца также описана передача CGMMV через семена. Изучали передачу CGMMV насекомыми, однако, конкретные связи между вирусом и насекомым не установлены. Тем не менее, в Индии были описаны случаи передачи CGMMV огуречным листоедом *Raphidopalpa faeveicollis*. Недавно были описаны случаи передачи CGMMV медоносными пчелами (*Apis mellifera*) при опылении (Darzi et al., 2017, Plant Pathology, 1365-3059, doi: 10.1111/ppa.12702). Кроме того, возможно, CGMMV в полевых условиях может также распространяться во время плодоношения через ножи, используемые для сбора плодов с больных растений. (Mandal et al., 2008, Plant Viruses 2(1), 25-34).

CGMMV является причиной серьезных заболеваний тыквенных культур по всему миру. В отношении арбуза, у парниковых растений были описаны пятнистость и мозаичность листьев. Также описано, что одновременно с заражением CGMMV возникают некротические пятна на цветоносе растений. Симптомы у плодов арбуза включают повреждение и гниение экзокарпа или

пожелтение мясистого мезокарпа, которые обычно определяются лишь после сбора урожая. (Reingold et al., 2013, New Disease Reports 28).

CGMMV является причиной серьезных экономических потерь во всем мире, в частности, при выращивании растений семейств *Cucurbitaceae* и *Solanaceae*. В некоторых районах Израиля при выращивании арбуза инфицирование CGMMV привело к полной потере урожая. (Reingold et al., 2016, Annals of Applied Biology 168, 29-40).

В работе Park et al. (2005, Plant Cell Rep 24, 350) описаны трансгенные растения *Citrullus lanatus*, подвид *gongdae* (дикий арбуз), которым была придана устойчивость к CGMMV путем введения кДНК, кодирующей белок оболочки CGMMV. *Citrullus lanatus*, подвид *gongdae*, не используют в качестве селекционного материала при коммерческом выращивании арбуза, однако, иногда используют в качестве подвоя для прививки при коммерческом выращивании арбуза. Предполагается, что устойчивый к CGMMV трансгенный арбуз подвиги *Gongdae* может быть использован в качестве подвоя для получения нетрансгенного коммерческого арбуза путем прививки прививочных черенков коммерческого арбуза к подвою трансгенного растения подвиги *Gongdae*.

В работе Lin et al. (2012, Transgenic Res 21, 983-993) описаны трансгенные растения арбуза (гибридный сорт Feeling), трансформированные одногенным конструктом сайленсинга, нацеленным на белки оболочки трех различных вирусов: вируса мозаики огурца (CMV), вируса зеленой крапчатой мозаики огурца (CGMMV) и вируса мозаики арбуза (WMV). В первом поколении трансгенных линий (R_0) были идентифицированы трансформированные растения, устойчивые ко всем трем вирусам. Тем не менее, в линиях R_1 , полученных путем самоопыления линий R_0 , устойчивость к CGMMV была утрачена, хотя устойчивость к двум другим вирусам сохранялась.

Науке известны растения *Citrullus colocynthis*, восприимчивые к CGMMV (Horváth, 1985, Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae 20(3-4), 225-251).

Борьба с CGMMV представляет определенные трудности, так как все коммерческие сорта являются восприимчивыми. Наилучшим вариантом для борьбы с вирусом является использование сортов, устойчивых к CGMMV. Однако

развитие устойчивости к CGMMV у разных тыквенных культур посредством классического размножения имеет определенные недостатки, поскольку источники резистентности хозяина известны лишь для дынь и диких видов *Cucumis* spp. (Mandal et al., 2008, Plant Viruses 2(1), 25-34).

Настоящим изобретением решается следующая проблема: обеспечение источников устойчивости к CGMMV и получение коммерческих растений *Citrullus*, устойчивых к CGMMV. В соответствии с одним аспектом изобретения растениями *Citrullus*, обладающими устойчивостью к CGMMV, являются растения арбуза вида *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*.

Первый аспект изобретения относится к природному растению или клетке, или части растения *Citrullus* без генетических модификаций, которые обладают устойчивостью к CGMMV. Предпочтительно, такое растение или клетка растения *Citrullus* представляет собой культурное растение или клетку культурного растения *Citrullus* без генетических модификаций, которые обладают устойчивостью к CGMMV.

На настоящий момент не описано каких-либо источников *Citrullus*, которые придают устойчивость к CGMMV. В ходе скрининга большой коллекции зародышевой плазмы различных образцов *Citrullus*, неожиданно был обнаружен образец *Citrullus colocynthis*, обладающий устойчивостью к CGMMV. Растение имело небольшие круглые плоды (ширина и длина – приблизительно 4 см) с белой мякотью и низким содержанием сухих веществ (приблизительно 2,0). Обладая устойчивостью растение (без симптомов, 4 балла согласно шкале, описанной в настоящем документе) было выбрано из гетерозиготного и/или гетерогенного образца семян (полученного из Национальной коллекции зародышевой плазмы США, ars-grin.gov), затем осуществляли стабилизирующий отбор по характеристике устойчивости в потомстве, полученном путем самоопыления в течение нескольких поколений. Репрезентативный образец семян растения *C. colocynthis* после стабилизирующего отбора, включающего характеристику устойчивости к CGMMV, был внесен в базу Nunhems B.V. под номером доступа NCIMB 42624 в соответствии с Будапештским договором.

На сегодняшний день это первый описанный материал, обладающий устойчивостью к CGMMV, в роде *Citrullus*. *Citrullus colocynthis* можно скрещивать

с другими видами *Citrullus*, например, с *Citrullus lanatus*. Таким образом, соответствующие растения, обладающие устойчивостью к CGMMV, в настоящее время впервые обеспечивают возможность переноса хромосомного фрагмента или фрагментов, придающих устойчивость к CGMMV (содержащих локус устойчивости к CGMMV), из устойчивого растения-донора в другие растения *Citrullus* (которые также могут именоваться «растениями-реципиентами»). Таким образом, растения *Citrullus colocynthis*, обладающие устойчивостью к CGMMV, описанные в настоящем документе, впервые обеспечивают возможность получать культурные растения *Citrullus*, такие как культурный арбуз (*C. lanatus* ssp *vulgaris*), обладающие устойчивостью к CGMMV. Это даст существенное преимущество при производстве сельскохозяйственной продукции, поскольку, если культивировать виды культур *Citrullus*, обладающие устойчивостью к CGMMV, можно избежать значительного снижения урожайности, вызванного заражением CGMMV, восприимчивых сельскохозяйственных культур, или, по крайней мере, уменьшить потери.

Установлено, что, помимо прочего, CGMMV передается через зараженные семенами. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает дополнительное преимущество для производителей семян, которые смогут не выбрасывать семена, полученные с полей, где растения заражены CGMMV. Некоторые устойчивые к CGMMV сорта огурца, например, сорт Bonbon компании Rijk Zwaan, продолжают являться носителями вируса, обеспечивая возможность существенного размножения вируса в растении (то есть они являются бессимптомными носителями и, следовательно, могут заражать вирусом другие растения). Представляется, что устойчивость растений, обеспечиваемая настоящим изобретением, препятствует размножению вируса в растении или, по меньшей мере, снижает уровни вируса до очень низких, как видно из примеров (см., например, Таблицу 2, где показано, что через 15, 35 и 60 дней после механической инокуляции CGMMV листьев, листья не содержат или имеют чрезвычайно низкий уровень вирусной РНК, в то время как положительные контрольные растения содержат значительные количества вирусной РНК). В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения уровень вируса настолько низок, что он не вызывает заражение CGMMV близких восприимчивых сортов арбуза и/или не

приводит к передаче вируса в семена, полученные из плодов таких растений. Это также продемонстрировано в разделе «Примеры».

Кроме того, можно сократить рабочие затраты производителей семян и фермеров, поскольку при выращивании растений *Citrullus*, обладающих устойчивостью к CGMMV, некоторые профилактические меры, например, дезинфекция инструментов для полевой обработки и обрезки растений, становятся излишними. В частности, поскольку CGMMV способен долгое время выживать в почве, получение растений *Citrullus*, обладающих устойчивостью к CGMMV, позволит выращивать последующие поколения растений *Citrullus* (включая, например, привитые растения, включающие прививочный черенок и/или подвой растения, обладающего устойчивостью к CGMMV, по изобретению) на той же территории или на том же поле, даже если ранее на соответствующей территории был обнаружен CGMMV.

При использовании по тексту настоящего документа термин «генетически модифицированный» означает прямую модификацию генома организма с использованием методов биотехнологии путем изменения генетической структуры организма с помощью техник введения нуклеиновых кислот, полученных вне соответствующего организма, непосредственно в хозяина, или введения нуклеиновых кислот, полученных вне соответствующего организма, в клетку, после чего осуществляют слияние, скрещивание или гибридизация такой клетки с конечным хозяином. Методы генной технологии включают технологии рекомбинантных нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) с последующим введением рекомбинантных нуклеиновых кислот, как напрямую, например, путем бомбардировки микрочастицами, микроинъекции, макроинъекции и методы микроинкапсулирования, так и не напрямую, например, с помощью векторной системы.

При использовании по тексту настоящего документа термин «генетически не модифицированный» означает модификацию генома организма и/или изменение генетической структуры организма с помощью техник, которые не включают введение в организм нуклеиновых кислот, полученных вне него.

При использовании по тексту настоящего документа термин «CGMMV» используют в качестве аббревиатуры выражения «*Cucumber Green Mottle Mosaic Virus*» (вирус зеленой крапчатой мозаики огурца).

При использовании по тексту настоящего документа термин «обладающий устойчивостью к CGMMV» означает, что растения или части растения определенной линии или сорта при инокуляции CGMMV не проявляют визуальных симптомов заражения CGMMV на листьях (4 балла) (и предпочтительно также не имеют симптомов внутри плодов); или, в соответствии с одним аспектом изобретения, у растений проявляются слабо выраженные симптомы (незначительная мозаичность и небольшое количество светлых пятен) на листьях (3 балла) (и, предпочтительно, плоды этих растений не проявляют каких-либо симптомов внутри и все еще обладают рыночной ценностью), в то время как чувствительные контрольные линии или сорта (например, Sugar Baby или другие сорта, восприимчивые к CGMMV) проявляют сильные симптомы на листьях (1 балл) и симптомы внутри плодов при проведении опытов в тех же условиях. Предпочтительно, считается, что линия или сорт растения обладают устойчивостью, если, по меньшей мере, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% растений линии соответствуют вышеупомянутой шкале (предпочтительно, по меньшей мере, 10, 15, 20, 25, 30 или более растений линии тестируют вместе с соответствующими контрольными линиями). Симптомы внутри плодов – это симптомы, при которых зрелый плод становится непригодным для употребления в пищу, например, порча мякоти и/или чрезмерное количество жидкости в мякоти. Тест, который может быть использован при оценке визуальных симптомов заражения CGMMV является, например, метод, описанный для механической инокуляции листьев в разделе «Примеры», пункты 1-3 «Общие методы» и ниже.

«Визуальные симптомы заражения CGMMV» на листьях классифицируют в настоящем документе в соответствии со следующей шкалой:

1 балл: сильные симптомы: деформация листа, пузырчатость и заметная мозаичность

2 балла: умеренные симптомы: незначительная деформация листа, однако, заметная мозаичность

3 балла: слабо выраженные симптомы: незначительная мозаичность и небольшое количество светлых пятен

4 балл: на листьях симптомы отсутствуют.

В соответствии с одним аспектом изобретения термин «устойчивость к CGMMV» включает в себя то, что растения и части растения, не имеющие симптомов на листьях (4 балла), а также, предпочтительно, внутри плодов, в некоторых случаях демонстрирующие слабо выраженные симптомы на листьях (3 балла) и предпочтительно не имеющие симптомов внутри плодов, содержат значительно более низкий средний уровень вируса (или титр вируса) в листьях (и, в некоторых случаях, также в плодах) через 15 дней после инокуляции (dpi), 30 dpi, 35 dpi, 60 dpi и/или 90 dpi (или позже) по сравнению с восприимчивой контрольной линией или сортом. В настоящем документе термин «значительно более низкий» относится к среднему уровню вируса, определяемому, например, путем ОТ-кПЦР, который, по меньшей мере, в 100 раз ниже, предпочтительно, по меньшей мере, в 1000 раз, 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 ниже чем для чувствительной контрольной ткани. В соответствии с одним аспектом изобретения в листьях и предпочтительно также в плодах обладающего устойчивостью растения уровень вируса CGMMV, определяемый путем ОТ-кПЦР через 15 dpi (дней после инокуляции), 30 dpi, 35 dpi, 60dpi и/или 90 dpi, ниже средней концентрации $1,5 \times 10^{-4}$ нг/мкл или ниже $1,3 \times 10^{-4}$ нг/мкл; в соответствии с одним аспектом изобретения средний уровень вируса еще ниже, например, ниже 5×10^{-5} нг/мкл или ниже 4×10^{-5} нг/мкл или ниже 3×10^{-5} нг/мкл или ниже 2×10^{-5} нг/мкл. В частности, в соответствии с одним аспектом изобретения средний титр вируса ниже 5×10^{-5} нг/мкл через 15 dpi и/или ниже 3×10^{-5} нг/мкл через 35 dpi и/или ниже 2×10^{-5} нг/мкл через 60 dpi или позже, или даже ниже предела обнаружения с использованием ОТ-кПЦР (или анализа TaqMan), в то время как восприимчивые контрольные растения проявляют симптомы и содержат значительно более высокий уровень вируса (например, по меньшей мере, в 100 раз более высокий, предпочтительно, по меньшей мере, в 1000 раз более высокий) при одинаковых условиях и по прошествии того же периода времени. В соответствии с одним аспектом изобретения средний титр вируса в устойчивой ткани с течением времени снижается, т.е. титр ниже через 35 dpi, чем через 15 dpi и ниже через 60 dpi, чем через 35 dpi.

Кроме того, в соответствии с одним аспектом изобретения вирус передается от растений по изобретению, обладающих устойчивостью к CGMMV, менее чем 1% других растений арбуза, например, восприимчивых растений арбуза, предпочтительно менее 0,5%, более предпочтительно 0% других растений арбуза. Тестирование передачи вируса может осуществляться, например, в соответствии с описанием в разделе «Примеры», с использованием в качестве посевного материала листьев растений устойчивых к CGMMV, инокулированных CGMMV, для инокуляции других растений и путем определения процента других инфицированных растений. В соответствии с еще одним аспектом семени, полученные из плодов растений по изобретению, обладающих устойчивостью к CGMMV, не содержат CGMMV. Опять же, тестирование может осуществляться в соответствии с описанием в разделе «Примеры».

При использовании по тексту настоящего документа термин «*Citrullus*» или «*Citrullus plant*» означает растение семейства *Cucurbitaceae*, принадлежащее роду *Citrullus*.

Род *Citrullus* включает четыре или пять видов: *Citrullus lanatus* (включая подвиды *lanatus*, *vulgaris* и *mucosospermus*), *Citrullus colocynthis* и дикие виды *Citrullus ecirrhosus* и *Citrullus rehmii* (Levi et al., 2001, Genetic Resources and Crop Evolution 48, 559-566). *Citrullus naudinianus*, пятый вид *Citrullus* настолько отличается от других видов *Citrullus* в макроскопической морфологии, что некоторые специалисты классифицируют его в роде *Acanthosicyos* (*A. naudinianus*). В контексте настоящего изобретения *Citrullus naudinianus* представляет род *Citrullus*. *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* обычно именуется культурным арбузом; этот вид представляет собой наиболее широко распространенную арбузную культуру. Таким образом, при использовании по тексту настоящего документа термин «культурный арбуз» относится к культурным растениям *Citrullus lanatus vulgaris*, например, к линиям или сортам *Citrullus lanatus*. Каждый из пяти видов *Citrullus* имеет диплоидное хромосомное число $2n = 22$. Указанные пять видов *Citrullus* могут скрещиваться друг с другом, и, таким образом, устойчивость к CGMMV может передаваться между растениями этих видов, например, с использованием селекционных процессов. (Kun-Peng Li et al., 2016, BMC Evolutionary Biology 16, 85).

Термин «клетка растения *Citrullus*» означает клетку растения, которая происходит, получена или может быть получена из растения *Citrullus* или любой его части. Такая клетка может быть пригодна для регенерации в целое растение (клетка растения, способная к регенерации), или она может быть не пригодна для регенерации в целое растение (клетка растения, неспособная к регенерации). Аналогичным образом, термин «клетка растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*» означает клетку растения, которая происходит, получена или может быть получена из растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* или любой его части. Такая клетка может быть пригодна для регенерации в целое растение (клетка растения, способная к регенерации), или она может быть не пригодна для регенерации в целое растение (клетка растения, неспособная к регенерации).

В контексте настоящего изобретения термин «культурное растение» используют в обычном значении и означает любое определенное растение или сорт, которые предназначены для промышленного выращивания или культивирования в целях получения прибыли или в целях производства пищевых продуктов, одежды, корма для домашнего скота, фуража, биотоплива, лекарств или в других целях. В частности, в контексте настоящего изобретения термин «культурное растение» означает любое определенное растение, которое предназначается для промышленного выращивания или культивирования в целях получения прибыли и которое собирают в целях производства пищевых продуктов после выращивания. Выражение «предназначается для выращивания», которое используют в настоящем определении, напрямую подразумевает, что термин «культурное растение» при использовании по тексту настоящего документа включает любой селекционный материал, который может быть использован для получения любого определенного растения, которое предназначается для промышленного выращивания или культивирования в целях получения прибыли и которое собирают в целях производства пищевых продуктов после выращивания.

При использовании по тексту настоящего документа термин «культурные растения *Citrullus*» включает растения вида *Citrullus lanatus* (в том числе подвиды *vulgaris*, *mucosospermus* или *lanatus*), *Citrullus colocynthis* и *Citrullus naudinianus*.

Термин «культурные растения» включает термин «культивируемые растения». В отношении арбуза в данной области (в том числе, в настоящем

документе) термин «культурное растение» обычно означает растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* (Kun-Peng Li et al., 2016, BMC Evolutionary Biology 16, 85).

Термин «пищевые продукты» в настоящем документе используют в обычном значении и означает любое питательное вещество, которое употребляют в пищу, пьют или иным образом вводят в организм человека.

Виды культурных растений рода *Citrullus* – *Citrullus lanatus*, *Citrullus colocynthis* или *Citrullus naudinianus* – могут скрещиваться между собой, что обеспечивает возможности переноса или интрогрессии устойчивости к CGMMV от одного из этих видов другому. Следовательно, может осуществляться интрогрессия устойчивости к CGMMV от растения *Citrullus colocynthis*, предусмотренного настоящим изобретением, например, от растений, которые получены или могут быть получены или имеют происхождение из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624 в другие растения *Citrullus colocynthis* (например, в растения восприимчивые к CGMMV), в растения вида *Citrullus lanatus* (например, в культурный арбуз) или в растения вида *Citrullus naudinianus*.

Таким образом, предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к генетически немодифицированному растению или клетке растения *Citrullus* по изобретению, причем указанное растение или клетка растения по изобретению выбраны из группы видов, состоящей из *Citrullus lanatus*, *Citrullus colocynthis* или *Citrullus naudinianus*. В соответствии с более предпочтительным вариантом осуществления изобретения генетически немодифицированное растение или клетка растения *Citrullus* по изобретению представляет собой растение или клетку растения *Citrullus lanatus*, наиболее предпочтительно растение или клетку растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*.

Семена обладающего устойчивостью к CGMMV растения *Citrullus colocynthis*, из которого могут быть получены клетки растения *Citrullus colocynthis* и один или несколько QTL (локусов количественных признаков) устойчивости к CGMMV, были внесены в базу под номером доступа NCIMB 42624, или являются его потомством, в частности, потомством, полученным путем самооплодотворения. Из таких внесенных в базу семян могут быть выращены обладающие устойчивостью к CGMMV растения *Citrullus colocynthis*, из которых

могут быть получены клетки растения *Citrullus colocynthis*. Аналогичным образом, из этих семян или из их потомства могут быть получены один или несколько QTL (локусов количественных признаков) *C. colocynthis*, которые придают устойчивость к CGMMV, при этом такое потомство сохраняет один или несколько или все QTL.

Авторами настоящего изобретения были обнаружены пять QTL в *C. colocynthis*, которые придают устойчивость к CGMMV, и которые могут быть перенесены по отдельности или в различных комбинациях от растения-донора *C. colocynthis* (например, NCIMB 42624 или от его потомства или, при необходимости, от другого растения *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, которое включает такие один или несколько QTL) в другие растения, например, в культурный арбуз. Указанные пять QTL подробно описаны в настоящем документе. Будет выполнено точное картирование, чтобы сузить участок хромосомы, где обнаружены QTL. Это позволит использовать фрагменты интрогрессии меньшей длины, тем самым устраняя сцепленный перенос (интрогрессию нежелательных характеристик, связанных с QTL) от донора.

Таким образом, в соответствии с одним частным вариантом осуществления изобретение относится к семенам *Citrullus colocynthis*, внесенным в базу под номером доступа NCIMB 42624, или к растениям, выращенным из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или к потомству таких растений, в частности, к потомству, полученному путем самоопыления, которые обладают устойчивостью к CGMMV в 4 балла по приведенной шкале (отсутствие симптомов). Соответственно, одним из вариантов осуществления настоящего изобретения являются растения *Citrullus colocynthis* или клетки растения *Citrullus colocynthis*, которые имеют происхождение/получены/могут быть получены из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или клетки растения *Citrullus colocynthis*, которые имеют происхождение/получены/могут быть получены из растений, выращенных из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624.

В соответствии с еще одним частным вариантом осуществления изобретение относится к растениям *Citrullus*, в частности, к культурным растениям арбуза, которые содержат один или несколько QTL устойчивости к CGMMV (в соответствии с описанием в настоящем документе), которые находятся в/имеют

происхождение/получены/могут быть получены из семян *Citrullus colocynthis*, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из растений, выращенных из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из потомства таких растений.

В соответствии с еще одним частным вариантом осуществления изобретение относится к растениям *Citrullus*, в частности, к культурным растениям арбуза, которые содержат один или несколько QTL устойчивости к CGMMV (в соответствии с описанием в настоящем документе), которые находятся в/имеют происхождение/получены/могут быть получены из растения или из семени растения *Citrullus colocynthis*, обладающих устойчивостью к CGMMV, которые содержат тот же или те же QTL, которые присутствуют в семенах, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или в растениях, выращенных из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или в потомстве таких растений. Такое растение *Citrullus colocynthis* обладает устойчивостью к CGMMV (4 балла по приведенной шкале) и содержит один или несколько или все маркеры SNP, связанные с одним или несколькими QTL. Таким образом, например, растение *C. colocynthis* может содержать QTL7.1 и, следовательно, также один или несколько или все маркеры SNP, связанные с QTL7.1, описанные ниже, например, в Таблице 1 и Таблице 6. Таким образом, например, в соответствии с одним аспектом изобретения растение *Citrullus colocynthis* содержит QTL7.1 и/или QTL9.1, предпочтительно растение содержит нуклеотид обладающего устойчивостью донора для SNP13, SNP14 и/или SNP15, связанных с QTL7.1 и/или нуклеотид обладающего устойчивостью донора для SNP22, SNP23 и/или SNP24, связанных с QTL9.1. В соответствии с еще одним аспектом изобретения растение *Citrullus colocynthis*, содержащее QTL1.1, QTL4.1, QTL5.2, QTL7.1 и/или QTL9.1, предпочтительно содержит нуклеотид обладающего устойчивостью донора для SNP4, SNP5 и/или SNP 6, связанных с QTL1.1, и нуклеотид обладающего устойчивостью донора для SNP7, SNP8 и/или SNP9, связанных с QTL4.1, и/или нуклеотид обладающего устойчивостью донора для SNP10, SNP11 и/или SNP12, связанных с QTL5.1, нуклеотид обладающего устойчивостью донора для SNP13, SNP14 и/или SNP15, связанных с QTL7.1 и/или нуклеотид обладающего устойчивостью донора для SNP22, SNP23 и/или SNP24, связанных с QTL9.1.

Предпочтительно, настоящее изобретение относится к генетически немодифицированным растениям или клеткам растения *Citrullus* по изобретению, содержащим интрогрессированную устойчивость к CGMMV, предпочтительно, устойчивость к CGMMV интрогрессирована в геном генетически немодифицированных растений или клеток растения *Citrullus* по изобретению.

В соответствии с более предпочтительным вариантом осуществления изобретение относится к генетически немодифицированным растениям или клеткам растения *Citrullus* по изобретению, где интрогрессированная устойчивость к CGMMV имеет происхождение/получена/может быть получена из растения или из клетки растения *Citrullus*, более предпочтительно устойчивость к CGMMV имеет происхождение/получена/может быть получена из растения *Citrullus colocynthis* или из клетки растения *Citrullus colocynthis*, в частности, из растения *Citrullus colocynthis*, репрезентативный образец семян которого, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из обладающего устойчивостью к CGMMV потомства такого растения (полученного, например, путем самоопыления). Для определения того, является ли устойчивость к CGMMV изначально присущей растению или получена ли она из депонированных семян, может быть использован анализ маркеров SNP или секвенирование участка хромосомы, содержащего один или несколько QTL.

Еще более предпочтительно, генетически немодифицированное растение или клетка растения *Citrullus* по изобретению представляет собой растение или клетку растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* с интрогрессированной в геном устойчивостью к CGMMV, где интрогрессированная устойчивость к CGMMV находится в/имеет происхождение/получена/может быть получена из растения или из клетки растения *Citrullus colocynthis*, соответственно, в частности, из растения или из клетки растения *Citrullus colocynthis*, репрезентативный образец семян которого, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из обладающего устойчивостью к CGMMV потомства такого растения (полученного, например, путем самоопыления).

В соответствии с одним аспектом изобретения растение-донор *Citrullus colocynthis*, из которого может быть получена устойчивость к CGMMV, представляет собой донорский образец, не проявляющий симптомов (4 балла) после механической инокуляции CGMMV в соответствии с описанием в разделе

«Примеры», и/или в котором титр вируса значительно снижен в различные моменты времени после инокуляции по сравнению с восприимчивым контрольным растением, например, титр меньше 5×10^{-5} нг/мкл при определении с использованием ОТ-кПЦР (TaqMan), и/или содержит один или несколько или все QTL1.1, QTL4.1, QTL5.2, QTL7.1 и/или QTL9.1 и, следовательно, один или несколько нуклеотидов обладающего устойчивостью донора для SNP маркеров, связанных с соответствующими QTL. В соответствии с одним аспектом изобретения донором является NCIMB 42624, или предок или потомство этого растения.

В соответствии с еще более предпочтительным вариантом осуществления изобретение относится к генетически немодифицированным растениям или клеткам растения *Citrullus* по изобретению, где интрогрессированная устойчивость к CGMMV присутствует в/имеет происхождение/получена/может быть получена из семени или клетки семени растения, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из обладающего устойчивостью к CGMMV потомства такого растения (полученного, например, путем самоопыления), или имеет происхождение/получена/может быть получена из растения, выращенного из указанного, внесенного в базу семени или из его потомства, или имеет происхождение/получена/может быть получена из клетки растения, которая получена или может быть получена из растения, выращенного из указанного, внесенного в базу семени или из его потомства. Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения растение или клетка растения содержат один или несколько фрагментов интрогрессии, придающих устойчивость к CGMMV из растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, например, из растения *Citrullus colocynthis*, репрезентативный образец семян которого, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из обладающего устойчивостью к CGMMV потомства такого растения (полученного, например, путем самоопыления).

В соответствии с еще более предпочтительным вариантом осуществления генетически немодифицированное растение или клетка растения *Citrullus* по изобретению представляет собой растение или клетку растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*, которые обладают интрогрессированной устойчивостью к CGMMV, где интрогрессированная устойчивость к CGMMV имеет

происхождение/получена/может быть получена из семени или клетки семени растения, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из обладающего устойчивостью к CGMMV потомства такого растения (полученного, например, путем самоопыления), или имеет происхождение/получена/может быть получена из растения, выращенного из указанного, внесенного в базу семени или выращенного из потомства такого внесенного в базу семени (полученного, например, путем самоопыления), обладающего устойчивостью к CGMMV, или имеет происхождение/получена/может быть получена из клетки растения, которая получена или может быть получена из растения, выращенного из указанного, внесенного в базу семени или выращенного из потомства такого внесенного в базу семени (полученного, например, путем самоопыления), обладающего устойчивостью к CGMMV. Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения растение или клетка растения представляют собой растение или клетку культурного арбуза, которые содержат в геноме один или несколько придающих устойчивость фрагментов интрогрессии (при этом указанный фрагмент или фрагменты содержат локус устойчивости к CGMMV, в частности, один или несколько QTL) из растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, например, из растения *Citrullus colocynthis*, репрезентативный образец семян которого, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из обладающего устойчивостью к CGMMV потомства такого растения (полученного, например, путем самоопыления).

Такое присутствие одного или нескольких придающих устойчивость фрагментов интрогрессии в реципиентном растении или клетке растения может быть обнаружено способами, известными специалисту, например, секвенирование всего генома, анализ молекулярных маркеров, QTL-картирование локуса устойчивости и/или другими способами, такими как фенотипический анализ, тесты на аллелизм и т.д. Аналогичным образом, такое присутствие одного или нескольких придающих устойчивость фрагментов интрогрессии в реципиентном растении или клетке растения может быть обнаружено с использованием маркеров, физически связанных с QTL, идентифицированных в растении-доноре *C. colocynthis* в соответствии с описанием в настоящем документе.

Дикий, произрастающий в пустыне вид растений *C. colocynthis* является диплоидным и имеет $2n = 22$ хромосомы, соответствующие хромосомам

культурного арбуза, в результате чего возможна интрогрессия из фрагмента хромосомы *C. colocynthis* в соответствующую хромосому *C. lanatus* подвид *vulgaris*. В образце *C. colocynthis* номер NCIMB 42624 были обнаружены пять QTL, придающие устойчивость к CGMMV, например, когда их интрогрессирую в культурный арбуз, восприимчивый к CGMMV. Было определено положение этих QTL в геноме, и были обнаружены SNP маркеры, связанные с этими QTL. Растение-донор *C. colocynthis* было гомозиготным по всем нуклеотидам SNP, как видно из генотипа SNP диплоидного донора. Указанные пять QTL именуются: QTL1.1, присутствующий на хромосоме 1, QTL4.1 присутствующий на хромосоме 4, QTL5.2 присутствующий на хромосоме 5, QTL7.1 присутствующий на хромосоме 7 и QTL9.1 присутствующий на хромосоме 9 секвенированного генома культурного арбуза. Область, где находится каждый из QTL, ограничена маркерами SNP (однонуклеотидного полиморфизма), перечисленными в Таблице 1 ниже. Когда эти последовательности используют в анализе BLAST по геному арбуза (сорт Charleston Gray), сайт cucurbitgenomics.org, обнаруживается нуклеотидная позиция одиночного полиморфизма в геноме арбуза. В Таблице указан маркер SNP, наиболее тесно связанный с QTL. Поскольку участки, ограниченные маркерами SNP, достаточно велики, очевидно, что не весь участок, ограничивающий каждый QTL, должен быть интрогрессирован в культурный арбуз, таким образом, в другие растения *Citrullus*, в частности, в культурный арбуз может интрогрессироваться лишь субучасток, содержащий QTL и придающий устойчивость к CGMMV.

Таблица 1

Хромосома культурного арбуза (Chr)	Нуклеотидное положение SNP в геноме арбуза (номер основания);	SNP маркер, наиболее тесно связанный с QTL (указывается наиболее тесно связанный маркер)	Нуклеотидная последовательность с SNP, указанная в следующем формате: [X/Y]; X – нуклеотид донора, обладающего устойчивостью к CGMMV; Y – нуклеотид восприимчивого рекуррентного родительского растения.	Генотип SNP донора, обладающего устойчивостью к CGMMV
Chr1 (QTL1.1)	6,555,391	SNP1 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO: 1	AAGTACAGTTGCAAATATAATAATCA GGTTTAAAATATTTGCAAATATAG[C/T] AAAATTTAGATTCTGCTTTTAAAGT CTAACAGTGATAGACCATATCAGTG (SEQ ID NO: 1)	CC
Chr1 (QTL1.1)	16,631,610	SNP2 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO: 2	GGAAAAAGAAATTACATGGAATGCAT CGTTATTGTTTCATTTATATCCCC[G/A] TATAGATCAATGTAAACTTGAAGTTC GGAAAATAATTCAATTTGCAAAATA (SEQ ID NO: 2)	GG
Chr1 (QTL1.1)	26,238,488	SNP3 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:3	TTGTTAGTGCAACAAATGTGTAGACA TGCATAAAACACTTGTTAGTGCAA[C/T] GAATGTGTTAGACATATATGACAAT AATAAAAAAATTTGAATATGAAAAT (SEQ ID NO: 3)	CC
Chr1 (QTL1.1)	34,609,471	SNP4 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:4	GGCGGAACGCCGACCGGAAGGTTTAG CAACGGCAAAATCCCCACCGATTT[C/T] GTAGGTGGGGCTCCTAATAATTCAT TTTATCTCTCCTCTAATAACATTTT (SEQ ID NO: 4)	CC
Chr1 (QTL1.1)	35,238,267	SNP5 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:5 (наиболее тесно связанный)	CTCTACATTAGAGAGGACTTTGAAGT TGTTGACAGGAAAACATGGCTGCA[G/A] GCAAGTTACTTTTAGCCCCAAGTTT TTAGTGGTTGATGTCTCTTTTAAAT (SEQ ID NO: 5)	GG

Chr1 (QTL1.1)	35,766,439	SNP6 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:6	TCTATTTTGC GTTCCACTCTTCGCATT CTCTCTTCTACAAGAAAATAGCC[T/C] CTATTCTATCTTCATTTAGGGGCTTTC TTTCTTATAACTTTTCATCTAGGG (SEQ ID NO: 6)	TT
Chr4 (QTL4.1)	4,230,711	SNP7 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:7	AATTTTGAACCTGATATAAACTCAAC ATCATTGATTAGATCGCAAACCTT[C/A] JGTTTGTTCTCAAGCTTCTTTTCATTGAA TCCAAATATTGAGTAAAATACAC (SEQ ID NO: 7)	TT
Chr4 (QTL4.1)	24,321,690	SNP8 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:8 (наиболее тесно связанный)	TTGGCGTGGGCTTGTACCATATAGTGT TTGCCTTCAAGTGATTGCAATTT[C/A] TAGTTTCAATCTTGAGTTTGGTATTCA ATACTGAAAGCCTCATTGCCATT (SEQ ID NO: 8)	CC
Chr4 (QTL4.1)	25,526,846	SNP9 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:9	TTATTTGTCAATTTTCATCAGCAAAAT TGTCTTGAAAATTGATGCTTAGC[A/G] TACCTTTTCTTTCTAGAAATGCTTCAA AACCTCCGGGTTCAATGGCGCAG (SEQ ID NO: 9)	AA
Chr5 (QTL5.2)	30,786,503	SNP10 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:10	AGATCAGATGCATTTACGTCCGGCTTC ACTTCATTTTGAGTAGAGTTCAC[T/C] GTTATTTTGTTGATGGATTTCGCCGAG ATAACACCAGACTTTTCTGGAGA (SEQ ID NO: 10)	TT
Chr5 (QTL5.2)	32,788,817	SNP11 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:11 (наиболее тесно связанный)	GAAGGGGCAATTGAACCCCTTGTCCA AATGTTCCGTA CTGAAAAGCTTGA[A/ G]GCTAAATTATCGGCATTAAGCGCAT TGCAAAGCCTCTCAGGCTTGAAGGA (SEQ ID NO: 11)	AA
Chr5 (QTL5.2)	36,842,501	SNP12 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:12	TAATGTGCCGAAC TCCAAATATTAAG GCACAAGGTTATGGTGTGGTGTGG[T/ C]GCTGAATGTACCACATTCTACGCCA TGCTATTCC TAACTTAAACCAGCCT (SEQ ID NO: 12)	TT

Chr7 (QTL7.1)	4,784,519	SNP13 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:13	GAGTTTTTCAAGTGATGATTTGAGTTG GGAGATCTGAGAGCCTTGGACAT[A/G]AGTGTCTCTCCTGTACATTTTTTGTG TTGGTTCAC TAGATTGTTGTTCT (SEQ ID NO: 13)	AA
Chr7 (QTL7.1)	7,848,633	SNP14 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:14 (наиболее тесно связанному)	TTTCGAGAAGACTTATCTCATACAATA GTATATGAGCTGAACTACTAGAG[A/G] AACATCAATCACAACTTTTCATCTGTT AAATCTTAGAAGAACTGGTTTGG (SEQ ID NO: 14)	AA
Chr7 (QTL7.1)	8,334,624	SNP15 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:15	TGACCACCCAAATATTTTCCAAATTTG CAGATTTTTTCAAAAAATGAAAG[G/A] TAGCGCAACTGCGCTCTAAAAGAGCA TAGCTACACTTTGGGAATTTTTTC (SEQ ID NO: 15)	GG
Chr7 (QTL7.1)	11,166,694	SNP16 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:16	ACTTTGTTTTTCTTCAATTCTCTCTAAA TTTATCATTCTAGATCACCTAT[G/T]AT CTTTAATGCCCTGGAAGTGTAAAAAT AAATTGTAATTTAAAGGAGTCA (SEQ ID NO: 16)	GG
Chr7 (QTL7.1)	18,775,728	SNP17 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:17	GGTGGTGCTGGTGATGTTGTTGATGTT AAGATTAAAGGCTCTTCTACTGG[T/C] TGGCTTCAAATGTCAAGGAATTGGGG TCAAAATTGGCAGGTTGGTACCTT (SEQ ID NO: 17)	TT
Chr7 (QTL7.1)	21,389,410	SNP18 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:18	ATAAAATTAAATGAAAACGCCTTAGA AACATCAGAGAATTCATTTCTCCA[A/ G]AAGGAAGAAGAATTCTGCAATAGA ATCCTAGAGTTGGAGAACAGACTGGA (SEQ ID NO: 18)	AA
Chr9 (QTL9.1)	31,394,464	SNP19 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:19	CGTCGGAGTTGGGCCTTAAGGCGAAT GTTAGTGTTGGTTGACAGATGGTT[C/T]TCATTGGAGTTGATCATCCAAGGTGG TCGTTGGAGCATGAAGTTGTTTCGG (SEQ ID NO: 19)	CC

Chr9 (QTL9.1)	32,499,549	SNP20 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:20	AAAGATGGAGAGGATCTTTGTAGGTT GCACGACCAACGCTTCCATTGGGA[G/ C]GCATGTCTCTCTGGTTCATGGTAAG CTGAATGACATTGTTGGAAGGGTAT (SEQ ID NO: 20)	GG
Chr9 (QTL9.1)	34,607,108	SNP21 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:21	GCCTCAACTTCGTTTCTTTTTTCTCTTT CTTTTATAGTTCCTCTACTATT[G/A]CT CCTTCTGTATCTCCTGCTGAGTTCTTTT GCTCTAACAACCAATTTTCT (SEQ ID NO: 21)	GG
Chr9 (QTL9.1)	35,343,850	SNP22 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:22 (наиболее тесно связанному)	TTATCAAGAGATCCATATAAGTATGTT GTCTACATCCATAAGATGCATGT[C/T] CAGATTTTTCATTACAGTCAGACTAAT TAAATATCTTAATGTAATTGCAT (SEQ ID NO: 22)	CC
Chr9 (QTL9.1)	36,923,004	SNP23 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:23	AATAAATAGTACAAATATCAATTTAT ACCCTAAACGATTTAAACCCCAAA[C/ T]TAATAGTTGTATCAATTAAAACCAT AAATTTTTCATTAGTGTATCAATTTA (SEQ ID NO: 23)	CC
Chr9 (QTL9.1)	38,321,162	SNP24 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:24	AAGGTAGGGTTTGGCCTTCAGGATAG TGACGACATTGATGCGTTGTTTGT[G/T] JAAATCTGTGGAGGAGGTTCCGTATAA TATCTCTGTGATTCAGATCAGTAA (SEQ ID NO: 24)	GG

В правой колонке представлен генотип SNP диплоидного донора, обладающего устойчивостью к CGMMV (например, NCIMB42624). Таким образом, устойчивый донорский нуклеотид каждого SNP является нуклеотид, указанный в этой колонке, то есть донорский нуклеотид SNP для SNP1 относится к нуклеотиду 'С' (цитозин) в нуклеотидном положении 51 в SEQ ID NO: 1, и т.д.

QTL7.1 и QTL9.1 являются доминантными и, следовательно, придают устойчивость, когда локус находится в гетерозиготной или гомозиготной форме. Эти два QTL играют наиболее важную роль для придания устойчивости к CGMMV,

поскольку наблюдается не только снижение симптомов заражения CGMMV до 3 баллов (слабо выраженные симптомы) или 4 баллов (отсутствие симптомов), но и существенно снижается титр (уровень) вируса до чрезвычайно низких значений (например, менее 5×10^{-5} нг/мкл при измерении в определенные моменты времени после инокуляции) или до уровней ниже уровня обнаружения. Остальные три QTL, QTL1.1, QTL4.1 и QTL5.2, являются рецессивными локусами, и (без ограничения объема настоящего изобретения) представляется, что они влияют на титр вируса в растениях.

В соответствии с одним аспектом изобретения предоставляются растения *Citrullus*, предпочтительно культурные растения арбуза, которые или клетки которых содержат один или два, или три, или четыре, или пять QTL (фрагменты интрогрессии из растения-донора *C. colocynthis* donor, например, из NCIMB 42624, или из других растений *C. colocynthis*, обладающих устойчивостью к CGMMV, степень выраженности симптомов у которых составляет 4 балла по указанной шкале, и которые содержат QTL), которые выбраны из группы, состоящей из QTL1.1, QTL4.1, QTL5.2, QTL7.1 и QTL9.1.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предоставляются растения *Citrullus*, предпочтительно культурные растения арбуза, которые или клетки которых содержат один или два или три или четыре QTL (фрагменты интрогрессии из растения-донора *C. colocynthis* donor, например, из NCIMB 42624, или из других растений *C. colocynthis*, обладающих устойчивостью к CGMMV, степень выраженности симптомов у которых составляет 4 балла по указанной шкале, и которые содержат QTL), которые выбраны из группы, состоящей из QTL1.1, QTL4.1, QTL7.1 и QTL9.1.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предоставляются растения *Citrullus*, предпочтительно культурные растения арбуза, которые или клетки которых содержат, по меньшей мере, один или два QTL (фрагменты интрогрессии из растения-донора *C. colocynthis* donor, например, из NCIMB 42624, или из других растений *C. colocynthis*, обладающих устойчивостью к CGMMV, степень выраженности симптомов у которых составляет 4 балла по указанной шкале, и которые содержат QTL), которые выбраны из группы, состоящей из QTL7.1 и/или QTL9.1. В соответствии с одним аспектом изобретения, при

необходимости, один или несколько рецессивных QTL, выбранных из QTL1.1, QTL4.1 и QTL5.2 могут комбинироваться с QTL7.1 и/или QTL9.1.

В соответствии с одним аспектом изобретения растением или клеткой растения представляет собой культурный арбуз и содержит, по меньшей мере, QTL7.1 и/или QTL9.1, при этом в некоторых случаях оба QTL находятся в гомозиготной форме.

Присутствие QTL может быть, например, определено на основании присутствия донорского нуклеотида SNP одного или нескольких или всех маркеров SNP, связанных с QTL, или путем секвенирования участков хромосом для обнаружения нуклеотидной последовательности фрагмента интрогрессии и, например, путем сравнения его с нуклеотидной последовательностью донора.

Если по тексту настоящего документа указано, что растение, часть растения или клетка растения арбуза «содержат QTL» или «содержат фрагмент интрогрессии, содержащий QTL» от растения-донора *C. colocynthis*, это означает, что хромосомная последовательность, содержащая QTL, была интрогрессирована в соответствующую хромосому культурного арбуза для получения рекомбинантной хромосомы. Это обнаруживается, например, путем секвенирования хромосомного участка и/или фрагмента интрогрессии, содержащего один или несколько или все донорские маркеры SNP, связанные с QTL. Кроме того, устойчивость к CGMMV должна быть перенесена с фрагментом интрогрессии, т.е. придавать фенотип устойчивости к CGMMV линии арбуза, при этом линия арбуза без фрагмента интрогрессии является восприимчивой к CGMMV.

В отношении происхождения интрогрессированной устойчивости к CGMMV не является существенным, интрогрессирована ли напрямую устойчивость к CGMMV из растения *Citrullus*, предпочтительно из растения или клетки растения *Citrullus colocynthis* в геном растения или клетки растения по настоящему изобретению, предпочтительно в растение или клетку растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*. Определяющее значение имеет то, что интрогрессированная устойчивость к CGMMV имеет происхождение из, получена или может быть получена из растения *Citrullus*, предпочтительно из растения или клетки растения *Citrullus colocynthis*, например, из растения-донора, внесенного в

базу данных под указанным номером, или из другого растения-донора, при этом степень выраженности симптомов у такого растения составляет 4 балла по указанной шкале (отсутствие симптомов). Устойчивость к CGMMV может, например, вначале интрогрессироваться из растения рода *Citrullus*, предпочтительно из вида *Citrullus colocynthis* в другой вид или подвид, например, в *Citrullus lanatus* (в том числе в подвиды *lanatus* и *mucosospermus*), *Citrullus ecirrhosus*, *Citrullus rehmanii*, *Citrullus naudinianus* или в другое растение или клетку растения *Citrullus colocynthis*, не обладающие устойчивостью к CGMMV, перед интрогрессией в растение или клетку растения по настоящему изобретению. Кроме того, не имеет определяющего значения, интрогрессирована ли устойчивость к CGMMV в различные виды или растения до того, как она интрогрессирована в растение или культурное растение по изобретению (например, в растение или клетку растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*). Определяющее значение имеет то, что устойчивость к CGMMV, которая интрогрессирована в растение или клетку растения по настоящему изобретению (например, в растение или в клетку растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*) изначально получена или может быть получена из растения или клетки растения *Citrullus*, предпочтительно *Citrullus colocynthis*. Таким образом, определяющее значение имеет происхождение хромосомного фрагмента, интрогрессированного в культурное растение или клетку культурного растения по настоящему изобретению (например, в растение или клетку культурного растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*), а не собственно этапы процесса интрогрессии или любого другого процесса размножения и/или их количество.

В настоящем документе термин «интрогрессия» используют в общепринятом в данной области значении и означает перемещение или введение хромосомного фрагмента или фрагментов из одного растения (донора) в генофонд другого растения того же или другого вида (реципиентное растение, также называемое рекуррентным растением или рекуррентным родительским растением). Соответственно, термин «интрогрессированная устойчивость к CGMMV» или «фрагмент интрогрессии» означает, из одного растения или клетки растения, обладающих устойчивостью к CGMMV, в другое растение или клетку растения, не обладающие устойчивостью к CGMMV, был введен хромосомный фрагмент или фрагменты, придающие устойчивость к CGMMV, т.е. содержащие

локус (QTL) устойчивости к CGMMV. Интрогрессия устойчивости к CGMMV в растение может осуществляться путем скрещивания или традиционных методов селекции, включая обратное скрещивание, то есть интрогрессия устойчивости к CGMMV может осуществляться методами селекции. Интрогрессия признака устойчивости к CGMMV в растение-реципиент – это технический антропогенный процесс. В частности, в настоящем документе термин «интрогрессия» относится к процессу или способу искусственного разведения. В таком процессе могут быть использованы один или несколько или все молекулярные маркеры, например, маркеры SNP в соответствии с настоящим изобретением. Полученное растение, т.е. культурная линия или сорт, которые содержат один или несколько фрагментов интрогрессии от донора, также являются искусственным и не существуют в природных условиях.

Фрагмент интрогрессии из растения *C. colocynthis*, содержащего QTL, может быть большим, например, он может составлять половину хромосомы, однако, предпочтительно он меньше, например, около 20 Мб (мегабаз), 18 Мб, 15 Мб или менее, например, приблизительно 10 Мб или менее, приблизительно 9 Мб или менее, приблизительно 8 Мб или менее, приблизительно 7 Мб или менее, приблизительно 6 Мб или менее, приблизительно 5 Мб или менее, приблизительно 4 Мб или менее, приблизительно 3,5 или 3 Мб или менее, приблизительно 2 Мб или менее, приблизительно 1 Мб (что равно 1 000 000 пар оснований или менее) или приблизительно 0,9 Мб (что равно 900 000 пар оснований) или менее, например, 0,8 Мб, 0,7 Мб, 0,6 Мб, 0,5 Мб или менее. В соответствии с одним аспектом фрагмент интрогрессии содержит физическую область, указанную по тексту настоящего документа (см., например, Таблицу 1 и 6), содержащую один или несколько из SNP или их подобласть, которая сохраняет соответствующий QTL.

Термин «локус устойчивости к CGMMV» или «QTL устойчивости к CGMMV» означает участок на хромосоме, в котором находится ген и аллель гена, придающие устойчивость к CGMMV. Таким образом, выражение «интрогрессированная устойчивость к CGMMV» означает, что интрогрессирован локус устойчивости к CGMMV, т.е. он присутствует на фрагменте интрогрессии. В настоящем документе локус/локусы устойчивости к CGMMV также именуется/именуются QTL (локус/локусы количественного признака).

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 1, 4, 5, 7 или 9. Рекомбинантная хромосома – это реципиентная хромосома, содержащая фрагмент интрогрессии донора. Таким образом, при использовании в настоящем документе термин «рекомбинантная хромосома 1 или 4 или 5 или 7 или 9» означает, что хромосома содержит фрагмент интрогрессии, содержащий QTL1.1 (хромосома 1), QTL4.1 (хромосома 4), QTL5.2 (хромосома 5), QTL7.1 (хромосома 7) или QTL9.1 (хромосома 9) из донора, обладающего устойчивостью к CGMMV.

«Маркерная селекция» или «MAS» - это процесс, когда присутствующие молекулярные маркеры (такие как маркеры SNP), которые генетически и физически связаны с конкретным локусом или с определенной областью хромосомы, используют для селекции растений на наличие конкретного локуса или участка. Например, молекулярный маркер (такой как маркеры SNP, указанные в таблице 1 и таблице 6), генетически и физически связанный с QTL1.1, QTL4.1, QTL5.2, QTL7.1 или QTL9.1, может быть использован для детекции и/или отбора растений или частей растений арбуза, содержащих QTL. Чем ближе связь молекулярного маркера с локусом, тем менее вероятно, что маркер диссоциируется от локуса при мейотической рекомбинации. Аналогичным образом, чем ближе два маркера связаны друг с другом, тем меньше вероятность того, что два маркера будут отделены друг от друга (и тем более вероятно, что они будут объединяться в единое целое). Термин «генотипирование» относится к методам, с помощью которых определяется генотип растения или клетки растения, или части растения, в частности, для одного или нескольких нуклеотидов, например, для одного или нескольких маркеров SNP. Генотип маркера SNP состоит из двух нуклеотидов в диплоидном растении или растительной клетке, трех нуклеотидов в триплоидном растении и четырех нуклеотидов в тетраплоидном растении или клетке.

«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 получаю 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 быть использован 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 могут иным образом чрезвычайно отличаться друг от друга относительно других локусов и генов.

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

Растение «гибрид F1» (или семя «гибрид F1») – это поколение, полученное путем скрещивания двух инбредных родительских линий. Таким образом, гибридные семена F1 представляют собой семена, из которых 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 подверглось инбридингу (например, по меньшей мере, 5, 6, 7 или более поколений), в результате чего получают линию растений с высокой однородностью.

На фенотипическом уровне растения или клетки культурных растений *Citrullus*, в которые интрогрессирована устойчивость к CGMMV, можно отличить от соответствующих растений или клеток растений *Citrullus*, поскольку они проявляют устойчивость к заражению CGMMV, то есть растения, содержащие фрагмент или фрагменты интрогрессии являются устойчивыми к CGMMV в соответствии с описанием в настоящем документе. На генетическом уровне растения или клетки культурных растений *Citrullus*, в которые интрогрессирована устойчивость к CGMMV, можно отличить от соответствующих растений или клеток растений *Citrullus*, поскольку их геном содержит один или несколько хромосомных фрагментов, придающих устойчивость к CGMMV, которые имеют происхождение их другого растения. Термин «соответствующий», который употребляется в отношении растений или клеток растения, сравниваемых друг с другом, означает, что эти растения или клетки растения при сравнении друг с другом имеют сходный или одинаковый фенотипический вид или генотип, за исключением того, что растение или клетка растения, в которые была интрогрессирована устойчивость к CGMMV, обладают устойчивостью к CGMMV и/или содержат один или несколько хромосомных фрагментов в геноме, которые придают устойчивость к CGMMV. Хромосомные фрагменты (фрагменты интрогрессии) содержат локус устойчивости, или QTL, описанный в настоящем документе. Растения, описанные в настоящем документе, имеют, например, геном *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*, однако, в их геном интрогрессирован один или несколько хромосомных фрагментов из *Citrullus colocynthis*, например, из NCIMB 42624, в результате чего такой интрогрессированный хромосомный фрагмент или фрагменты придают устойчивость к CGMMV. Интрогрессированные фрагменты имеют происхождение из донора, в то время как остальная часть генома имеет происхождение из реципиента.

В настоящем документе термин «хромосомный фрагмент» или «фрагмент интрогрессии» или «интрогрессированный фрагмент» означает любой фрагмент, состоящий из последовательности ДНК в геноме, которая, когда она присутствует или отсутствует в геноме, определяет функцию и/или фенотип растения. В контексте настоящего изобретения хромосомный фрагмент, интрогрессированный в растение или в клетку растения по настоящему изобретению и, следовательно, присутствующий в геноме растения или клетки растения по настоящему

изобретению, придает фенотип устойчивости к CGMMV (в некоторых случаях, фенотип может выражаться лишь тогда, когда фрагмент присутствует в гомозиготной форме). Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения растение без хромосомного фрагмента(-ов), например, растение культурного арбуза без фрагментов *C. colocynthis* в геноме, будет восприимчивым к CGMMV, а растение, содержащее один или несколько таких хромосомных фрагментов, будет устойчивым к CGMMV.

Хромосомный фрагмент может описываться или определяться определенными молекулярными маркерами (RFLP, AFLP, RADP, SNP и т.д.), физическим участком хромосомы, присутствующими или отсутствующими генами или специфическими аллелями, определенными последовательностями кДНК или геномными ДНК, последовательностями белков, кодируемыми присутствующими или отсутствующими ДНК и т.д. В соответствии с одним аспектом изобретения хромосомные фрагменты описаны или определены в настоящем документе маркерами однонуклеотидного полиморфизма (маркеры SNP), связанными с QTL, который придает устойчивость к CGMMV, при этом одиночный нуклеотид растения-донора *C. colocynthis* отличается в положении маркера SNP от одиночного нуклеотида реципиента. Таким образом, хромосомный фрагмент, который содержит QTL, может определяться физической областью и/или маркерами SNP и последовательностями, содержащими маркеры SNP, между которыми расположен интрогрессированный фрагмент, и/или нуклеотидами маркеров SNP (донорскими нуклеотидами SNP), присутствующими на интрогрессированном фрагменте (и отсутствующими у восприимчивого реципиента без интрогрессированного фрагмента).

В контексте настоящего изобретения термин «SNP» (= одиночный нуклеотидный полиморфизм)» означает вариацию в единственном нуклеотиде в определенном положении в геноме. SNP – это вариация одного нуклеотида в определенном положении в геноме двух растений. Если растение-донор (например, растение *C. colocynthis*), имеющее локус устойчивости к CGMMV, в соответствующей последовательности в определенном отдельном положении имеет нуклеотид, отличный от соответствующего нуклеотида в том же положении реципиентного растения дыни (например, культурного арбуза, восприимчивого к CGMMV), это положение определяет SNP между донором и реципиентом. Если

растение-донор имеет один из четырех возможных нуклеотидов (А, С, Т или G) в определенном положении, SNP возникает, если растение-реципиент имеет один из оставшихся трех возможных нуклеотидов в том же соответствующем положении последовательности. Поэтому в культурном растении арбуза, содержащем фрагмент интрогрессии от донора, можно легко определить, получен ли единственный нуклеотид SNP от донора (донорский нуклеотид SNP) или от культурного арбуза (реципиентный нуклеотид SNP или нуклеотид SNP восприимчивого растения). Хромосомами культурного арбуза являются, например, хромосомы, указанные на сайте cucurbitgenomics.org; с применением BLAST-анализа относительно генома арбуза (сорт «Charleston Gray») с использованием любой из последовательностей, содержащих донорский SNP (т.е. любую из SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 24), можно определить хромосомное положение SNP в геноме культурного арбуза.

Таким образом, в соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения в геном генетически немодифицированных растений или клеток растения *Citrullus* по настоящему изобретению, содержащих интрогрессированную устойчивость к CGMMV, интрогрессирован хромосомный фрагмент другого растения или клетки растения, придающий устойчивость к CGMMV. Соответственно, геном растений и клеток растений по настоящему изобретению, содержащих интрогрессированную устойчивость к CGMMV, отличается в конкретном локусе устойчивости к CGMMV или в геномной области, содержащей локус устойчивости к CGMMV, от соответствующих растений или клеток растения, не обладающих устойчивостью к CGMMV.

Специалист сможет определить, отличается ли растение или клетка растения, обладающие устойчивостью к CGMMV в конкретном локусе устойчивости к CGMMV или в области, содержащей такой локус, от соответствующих растений или клеток растения, не обладающих устойчивостью к CGMMV, с использованием одного или нескольких известных методов, таких как фенотипический анализ, секвенирование всего генома, анализ молекулярных маркеров, картирование признаков, окрашивание хромосом, тесты на аллелизм и других подобных методов или их комбинаций. Аналогичным образом можно использовать маркеры SNP, связанные с QTL, описанные в Таблице 1 и Таблице 6, в соответствии с описанием ниже.

Растения *Citrullus*, обладающие устойчивостью к CGMMV, могут быть получены различными обычными способами, известными специалисту. Можно использовать семена, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или их обладающее устойчивостью потомство. Особое преимущество этих внесенных в базу данных семян состоит в том, что растения, выращенные из семян, обладают устойчивостью к CGMMV и что растения являются гомозиготными по QTL и маркерам SNP. Таким образом, хромосомный фрагмент, придающий устойчивость к CGMMV, может быть введен или интрогрессирован в другие растения *Citrullus* с использованием, например, пыльцы растений *Citrullus*, обладающих устойчивостью к CGMMV для оплодотворения других растений *Citrullus*, например, других культурных растений *Citrullus*, в частности, растений *Citrullus lanatus*, в частности, растений *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* (культурный арбуз). Хромосомные фрагменты, придающие устойчивость к CGMMV, на хромосоме 7 (QTL7.1) и хромосоме 9 (QTL9.1), являются доминантными, по меньшей мере, у диплоидных растений. Таким образом, после скрещивания растения *Citrullus*, обладающего устойчивостью к CGMMV, например, растения, выращенного из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, (или его устойчивого потомка), с другим растением *Citrullus* устойчивость к CGMMV обеспечивается уже в поколении F1. Затем может осуществляться обратное скрещивание растений с восприимчивым родителем (реципиентом) для уменьшения донорского генома, сохраняя при этом фрагменты интрогрессии донорского генома, придающие устойчивость к CGMMV.

Можно идентифицировать другие образцы *Citrullus colocynthis*, обладающие устойчивостью к CGMMV, путем тестирования устойчивости таких образцов к CGMVV, предпочтительно путем сравнения растений, выращенных из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, (или их устойчивых потомков) и восприимчивых контрольных растений, например, растений сорта Sugar Baby. Например, для идентификации образцов *Citrullus colocynthis*, обладающих одинаковым уровнем устойчивости к CGMMV и/или одинаковым или сопоставимым уровнем вирусной РНК с растениями, выращенными из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, (или с их устойчивыми потомками) может применяться механическая инокуляция листьев и/или анализ маркеров SNP (генотипирование) и/или ОТ-кПЦР в соответствии с описанием в

разделе «Примеры». Кроме того, идентификация образцов *Citrullus colocynthis*, обладающих устойчивостью к CGMMV, может осуществляться путем анализа генотипа на наличие одного или нескольких маркеров SNP, указанных в Таблице 1 и Таблице 6. Таким образом, образцы *Citrullus colocynthis*, содержащие тот же нуклеотид, что и донор *C. colocynthis* NCIMB 42624 (т.е. содержащие донорский нуклеотид) для одного или нескольких или всех SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и/или SNP18, с наибольшей вероятностью содержат QTL7.1 в геноме. Аналогичным образом, образцы *Citrullus colocynthis*, содержащие то же нуклеотид, что и донор *C. colocynthis* NCIMB 42624 (т.е. содержащие донорский нуклеотид) для одного или нескольких или всех из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и/или SNP24 с наибольшей вероятностью содержат QTL9.1 в геноме. Это же справедливо для QTL1.1, QTL4.1 и QTL5.2 и соответствующих маркеров SNP, связанных с этими QTL (см., например, Таблицы 1 и 6).

В соответствии с одним аспектом изобретения растения или клетки растений *Citrullus* по настоящему изобретению включают растения *Citrullus*, имеющие любую плоидность, в том числе растения с четной плоидностью (2n, 4n, 6n, 8n и т.д.) и растения с нечетной плоидностью (3n, 5n и т.д.). Поскольку признак устойчивости, который придается QTL7.1 и QTL9.1, является доминантным, растения и клетки растений будут обладать устойчивостью к CGMMV даже в том случае, когда фрагмент интрогрессии находится в гетерозиготном состоянии в полиплоидах с четной плоидностью (одна копия в 2n, две копии в 4n, четыре копии в 8n, и т.д.).

Полиплоидия широко распространена у растений. Она отвечает за увеличение генетического разнообразия и производство видов с повышенной устойчивостью, увеличенными размерами, мощностью и стойкостью к болезням. Очевидными преимуществами полиплоидных растений являются гетерозис и избыточность генов.

Для ряда современных плантационных культур и культур, выращиваемых на больших площадях, производили одну или несколько дупликаций генома. Примерами являются хлопок, картофель, пшеница обыкновенная, семена масличных культур, кукуруза, соя, подсолнечник, банан, яблоко и кофе (Renny-Byfield 7 Wendel, 2014, American J. Botany, 101 (10), 1711-1725).

В частности, в селекции овощей, полиплоидия у различных растений была вызвана использованием химических веществ, включая колхицин, колхамин, оризалин, колцемид, трифлуралин или амипрофосметил. Примерами дубликаций генома в овощах, полученных использованием химических веществ, являются диплоидная брюссельская капуста из гаплоидных растений, тетраплоидный горох, тетраплоидные арбузы, тетраплоидные мускатные дыни, тетраплоидный лук, октаплоидные колоказии съедобные, тетраплоидные трихозанты змеевидные, триплоидные и тетраплоидные индийские огурцы, тетраплоидные огурцы и тетраплоидная фасоль обыкновенная (Kazi, 2015, J. Global Biosciences 4(3), 1774-1779).

В соответствии с одним аспектом изобретение относится к генетически немодифицированным растениям или клеткам растений *Citrullus* по настоящему изобретению, имеющим любую плоидность, при этом плоидность может быть четной или нечетной, предпочтительно плоидность составляет $2n$, $3n$ или $4n$.

Относительно нечетной плоидности, предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к генетически немодифицированным растениям или клеткам растений *Citrullus* по изобретению, которые являются диплоидными триплоидными ($3n$). В соответствии с одним аспектом изобретения растения или клетки растения относятся к виду *C. lanatus* подвид *vulgaris* и являются триплоидными и содержат фрагмент интрогрессии, по меньшей мере, на одной из трех гомологичных хромосом или на двух из трех хромосом или предпочтительно на всех трех гомологичных хромосомах (т.е. растение или клетка растения гомозиготны по фрагменту интрогрессии, придающему устойчивость к CGMMV). Такое триплоидное растение или семя, из которого произрастает такое триплоидное растение, могут с легкостью быть получены путем скрещивания диплоидного арбуза, содержащего, например, фрагмент интрогрессии в гомозиготной форме, с тетраплоидным арбузом, содержащим, например, фрагмент интрогрессии в гомозиготной форме (в четырех копиях, например, полученных путем удвоения хромосом гомозиготного диплоида). Полученные семена представляют собой триплоидные семена, из которых можно вырастить триплоидное растение арбуза. Такие триплоидные семена и триплоидные растения обладают устойчивостью к CGMMV и являются одним из аспектов изобретения.

В соответствии с одним аспектом изобретения триплоидные растения представляют собой культурные растения, части растений или клетки растения арбуза, содержащие QTL7.1 и/или QTL9.1, предпочтительно в гомозиготной форме (то есть три копии). В некоторых случаях культурные растения, части растений или клетки растения арбуза дополнительно содержат QTL, выбранный из группы QTL1.1, QTL4.1 и QTL5.2 в гомозиготной форме (три копии). Таким образом, фрагмент интрогрессии каждого QTL присутствует в трех копиях (включая три рекомбинантных хромосомы, например, три рекомбинантных хромосомы 7 и/или 9) в триплоидном растении или в клетке триплоидного растения, при этом один или несколько маркеров SNP, связанных с QTL, присутствуют в трех копиях и содержат донорский нуклеотид в трех копиях.

В соответствии с одним аспектом изобретения триплоидные растения представляют собой культурные растения арбуза, содержащие один или несколько или все QTL, выбранные из QTL1.1, QTL4.1, QTL5.2, QTL7.1 и QTL9.1, в гомозиготной форме (то есть три копии). Затем, в триплоидном растении или клетке растения предпочтительно присутствуют донорские нуклеотиды одного или нескольких маркеров SNP, связанных с каждым QTL, в трех копиях.

Относительно четной плоидности, предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к генетически немодифицированным растениям или клеткам растений *Citrullus* по изобретению, которые являются диплоидными (2n) или тетраплоидными (4n). В соответствии с одним аспектом изобретения растения или клетки растения относятся к виду *C. lanatus* подвид *vulgaris* и являются диплоидными и содержат фрагменты интрогрессии в гетерозиготной или гомозиготной форме; в соответствии с еще одним аспектом изобретения растения или клетки растения относятся к виду *C. lanatus* подвид *vulgaris* и являются тетраплоидными и содержат фрагменты интрогрессии в гетерозиготной (две копии) или гомозиготной (четыре копии) форме. Такие диплоидные и тетраплоидные семена, а также диплоидные и тетраплоидные растения обладают устойчивостью к CGMMV и являются одним из аспектов изобретения. Они могут быть использованы в качестве родительских растений для производства триплоидных семян и растений, устойчивых к CGMMV.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения диплоидные растения представляют собой культурные растения арбуза, содержащие QTL7.1

и/или QTL9.1, предпочтительно в гомозиготной или гетерозиготной форме. В некоторых случаях культурные растения, части растений или клетки растения арбуза дополнительно содержат QTL, выбранный из группы QTL1.1, QTL4.1 и QTL5.2 в гомозиготной форме (две копии). Таким образом, когда QTL присутствует в гомозиготной форме, например, в инбредной линии, фрагмент интрогрессии каждого QTL присутствует в двух копиях (включая две рекомбинантных хромосомы, например, две рекомбинантных хромосомы 7 и/или 9) в диплоидном растении или в клетке диплоидного растения, при этом один или несколько маркеров SNP, связанных с QTL, присутствуют в двух копиях и содержат донорский нуклеотид в двух копиях.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения диплоидные растения представляют собой культурные растения арбуза, содержащие один или несколько или все QTL, выбранные из QTL1.1, QTL4.1, QTL5.2, QTL7.1 и QTL9.1 в гомозиготной или гетерозиготной форме.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения тетраплоидные растения представляют собой культурные растения арбуза, содержащие QTL7.1 и/или QTL9.1 в гетерозиготной форме (четыре копии QTL7.1 и/или QTL9.1) или в гетерозиготной форме (две копии QTL7.1 и/или QTL9.1). В некоторых случаях культурные растения, части растений или клетки растения арбуза дополнительно содержат QTL, выбранный из группы QTL1.1, QTL4.1 и QTL5.2 в гетерозиготной или в гомозиготной форме (две копии или четыре копии, соответственно).

В соответствии с еще одним аспектом изобретения тетраплоидные растения представляют собой культурные растения арбуза, содержащие один или несколько или все QTL, выбранные из QTL1.1, QTL4.1, QTL5.2, QTL7.1 и QTL9.1 в гомозиготной или гетерозиготной форме.

В контексте настоящего изобретения выражение «четная плоидность» означает, что при делении на два количества гомологичных наборов хромосом, присутствующих в клетке или организме, получают целое число. Клетки или организмы, следовательно, являются диплоидными (2n), тетраплоидными (4n), гексаплоидными (6n), октаплоидными (8n) и т.д.

В контексте настоящего изобретения выражение «нечетная плоидность» означает, что при делении количества гомологичных наборов хромосом,

присутствующих в клетке или организме, на два не получают целое число. Клетки или организмы, следовательно, являются гаплоидными ($1n$), триплоидными ($3n$) и т.д.

В контексте настоящего изобретения выражение «диплоидное растение или клетка растения» означает растение, вегетативные части растения, плод, семя или клетку растения, которые имеют два набора соответствующих хромосом; такие растения или клетки обозначены в настоящем документе $2n$.

В контексте настоящего изобретения выражение «тетраплоидное растение или клетка растения» означает растение, вегетативную часть растения, плод, семя или клетку растения, которые имеют четыре набора соответствующих хромосом; такие растения или клетки обозначены в настоящем документе $4n$.

В контексте настоящего изобретения выражение «триплоидное растение или клетка растения» означает растение, вегетативную часть растения, плод, семя или клетку растения, которые имеют три набора соответствующих хромосом; такие растения или клетки обозначены в настоящем документе $3n$.

Специалистам очевидно, что клетки растений, размножающиеся половым путем (пыльца и семязачаток), содержат набор хромосом, который составляет половину набора оставшихся клеток указанного растения. Из пыльцы растений и семязачатков можно получить целые растения. Таким образом, если растения имеют четную плоидность, как правило, можно уменьшить плоидность наполовину после регенерации пыльцы или семязачатков. Из растений по настоящему изобретению с четной плоидностью (например, $2n$, $4n$, $6n$, $8n$ и т.д.), могут быть получены растения с половинным набором хромосом (например, $1n$, $2n$, $3n$, $4n$ и т.д., соответственно) путем регенерации пыльцы или семязачатка.

Диплоидные ($2n$) растения по изобретению могут, например, быть получены из клеток пыльцы или клеток семязачатка, содержащих устойчивость к CGMMV, при этом такие клетки пыльцы или семязачатка получены из тетраплоидного растения, содержащего фрагменты, придающие устойчивость к CGMMV. Предпочтительно, клетки пыльцы или семязачатка, получены из тетраплоидного растения, содержащего фрагменты, придающие устойчивость к CGMMV, в гомозиготном состоянии. Затем полученные диплоидные растения могут быть

использованы для дальнейшего размножения и получения растений с фенотипом устойчивости к CGMMV.

В соответствии с одним аспектом изобретения растения представляют собой культурные растения арбуза, которые являются диплоидными (2n), тетраплоидными (4n) или триплоидными (3n) и содержат, по меньшей мере, одну хромосому из гомологичных хромосом, содержащих фрагмент интрогрессии, придающий устойчивость к CGMMV в соответствии с описанием. В соответствии с одним аспектом изобретения, по меньшей мере, две, три или все четыре гомологичных хромосомы содержат указанный фрагмент интрогрессии.

Триплоидные (3n) растения, в частности, триплоидные растения культурного арбуза, могут быть получены путем скрещивания диплоидного (2n) растения с тетраплоидным (4n) растением. Семена гибридных растений, полученных в результате такого скрещивания, будут триплоидными (3n).

По меньшей мере одно растение из диплоидных (2n) и тетраплоидных (4n) растений, скрещенных друг с другом, обладает устойчивостью к CGMMV. Предпочтительно диплоидные (2n) и тетраплоидные (4n) растения по изобретению, скрещенные друг с другом, являются устойчивыми к CGMMV. В соответствии с одним аспектом изобретения как диплоидное, так и тетраплоидное растение, в частности, культурные растения арбуза, являются гомозиготными по фрагменту интрогрессии (т.е. диплоидное растение содержит две копии, а тетраплоидное растение – четыре копии фрагмента интрогрессии), а полученное триплоидное растение содержит три копии фрагмента интрогрессии.

Растения с нечетной плоидностью, например, триплоидные (3n) растения, как правило, являются растениями с мужской и женской стерильностью, так как при мейозе хромосомы не разделяются поровну между двумя дочерними клетками. Таким образом, для получения плодов без косточек можно выращивать семена с нечетной плоидностью, например, триплоидные растения.

В соответствии с одним аспектом изобретения диплоидное растение представляет собой культурное растение арбуза, содержащее фрагмент интрогрессии из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, например, из NCIMB 42624, или из его потомка, обладающего устойчивостью к CGMMV, при этом указанный фрагмент придает культурному

растению арбуза устойчивость к CGMMV. Поскольку в образце NCIMB 42624 присутствуют пять QTL, в соответствии с одним аспектом изобретения диплоидное растение представляет собой культурное растение арбуза, содержащее один или несколько или все QTL, выбранные из QTL1.1, QTL4.1, QTL5.2, QTL7.1 и QTL9.1.

Как было указано, такое культурное растение арбуза можно получить путем обратного скрещивания (одного или нескольких обратных скрещиваний) и введения локуса устойчивости к CGMMV от растения-донора (или, например, путем скрещивания NCIMB 42624, или его потомка, обладающего устойчивостью к CGMMV) в элитную линию или сорт культурного арбуза. После одного или нескольких самоопылений растения, полученного обратным скрещиванием, фрагменты интрогрессии станут гомозиготными, и растение будет содержать локус устойчивости к CGMMV, который присутствует у донора или который может быть получен от донора, например, NCIMB 42624.

После удвоения числа хромосом такого диплоидного растения будет получено тетраплоидное растение, являющееся гомозиготным по фрагментам интрогрессии, и растение будет содержать локус устойчивости к CGMMV, который присутствует у донора или который может быть получен от донора, например, NCIMB 42624. Путем последующего скрещивания гомозиготного диплоидного растения с гомозиготным тетраплоидным растением можно получить триплоидное растение, содержащее локус устойчивости к CGMMV, который присутствует у донора или который может быть получен от донора, например, NCIMB 42624.

Таким образом можно получить диплоидные растения арбуза, содержащие лишь один из пяти QTL, а также растения, содержащие различные комбинации QTL. Аналогичным образом можно получить тетраплоидные и триплоидные растения, содержащие лишь один из пяти QTL и различные комбинации QTL.

Частный вариант осуществления настоящего изобретения относится к культурным растениям арбуза, содержащим, по меньшей мере, один из доминантных QTL, QTL7.1 и/или QTL9.1. в некоторых случаях эти растения могут содержать в геноме один или несколько рецессивных QTL, QTL1.1, QTL4.1 и/или QTL5.2, предпочтительно в гомозиготной форме.

SNP, предоставляемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть использованы для различных целей. Их можно использовать для определения

области, содержащей QTL, или для обнаружения (например, в донорском материале или в культивируемом материале, например, в ходе диагностических анализов) фрагментов интрогрессии, содержащих QTL, или их можно использовать в ходе применения методов маркерной селекции для передачи QTL от донора растению-реципиенту или от одной линии скрещивания или сорта другой линии скрещивания или сорту.

Маркеры SNP, связанные с QTL, а также их положение в геноме арбуза (то есть на соответствующей хромосоме культурного арбуза), указаны в Таблице 1 выше. Также указан генотип SNP резистентного донора, при этом донор является гомозиготным по SNP и по последовательности (например, донорский SNP или донорная последовательность для SNP1 – цитозин (C) на нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 1. Следовательно, генотип диплоидного донора – «CC» (цитозин/цитозин), включающий две копии SEQ ID NO: 1 и две копии донорского нуклеотида SNP1.

Поскольку у других доноров *C. colocynthis* могут присутствовать варианты QTL, донорский SNP может присутствовать в нуклеотидных последовательностях с незначительными вариациями, например, один, два или три нуклеотида SEQ ID NO: 1 могут отличаться от нуклеотидов SEQ ID NO: 1, при этом в эквивалентном положении все еще может присутствовать донорский нуклеотид SNP *C. colocynthis* (для SNP1 – это цитозин) при попарном выравнивании последовательностей.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP1» или «маркер SNP1» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 1 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP1, т.е. цитозина (C) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 1 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 1 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 1) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 и содержащая цитозин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 1 содержит донорский нуклеотид (т.е. цитозин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид

для SNP1 (т.е. цитозин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 1» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52 или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP1, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 1 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1), т.е. генотип «СС». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP1, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 1 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, гуанин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 1 (SNP1), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это тимин для SNP1, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

«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», 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, 1992, PNAS 89, 10915-10919). Выравнивания последовательности и показатели процента идентичности последовательности, например, могут быть определены с помощью компьютерных программ, таких как EMBOSS, которая доступна по адресу: ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). В качестве альтернативы процент сходства или идентичности может быть определен 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, 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 последовательности, по меньшей мере, 80%, например, с идентичностью нуклеотидной последовательности, по меньшей мере, 95%, 98% или 99% с эталонной последовательностью, в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения считается, что указанная нуклеотидная последовательность имеет существенную идентичность последовательности с определенной нуклеотидной последовательностью и может быть идентифицирована с использованием жестких условий гибридизации.

«Жесткие условия гибридизации» используют для идентификации нуклеотидных последовательностей, которые существенно идентичны определенной нуклеотидной последовательности. Жесткость условий зависит от определенной последовательности и в различных случаях будет различной. Обычно жесткие условия означает следующее: температура составляет на 5°C ниже точки плавления (T_m) для определенной последовательности при определенной ионной силе и pH. T_m – это температура (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% целевой последовательности гибридизирует с подобранным зондом. Обычно жесткие условия будут выбраны таким образом, что концентрация солей составляет приблизительно 0,02 моль при pH 7 и температуре, по меньшей мере, 60°C. Снижение концентрации солей и/или повышение температуры увеличивает жесткость условий. Жесткие условия для РНК-ДНК гибридизации (нозерн-блоттинг с использованием, например, зонда длиной 100 нуклеотидов) представляют собой, например, такие условия, которые включают, по меньшей мере, одну промывку в 0,2 x SSC при 63°C в течение 20 минут, или эквивалентные условия. Жесткие условия для ДНК-ДНК гибридизации (Саузерн-блоттинг с использованием, например, зонда длиной 100 нуклеотидов) представляют собой, например, такие условия, которые включают, по меньшей мере, одну промывку (как правило, две промывки) в 0,2 x SSC, по меньшей мере, при 50°C, как правило, приблизительно, 55°C, в течение 20 минут, или эквивалентные условия. См. также Sambrook et al. (1989) и Sambrook и Russell (2001).

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP2» или «маркер SNP2» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 2 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP2, т.е. гуанина (G) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 2 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 2 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 2) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и содержащая гуанин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 2 содержит донорский нуклеотид (т.е. гуанин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего

документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP2 (т.е. гуанин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 2» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52 или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP2, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 2 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2), т.е. генотип «GG». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP2, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 2 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, цитозин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 2 (SNP2), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это аденин для SNP2, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP3» или «маркер SNP3» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 3 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Вместо

упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP3, т.е. цитозина (C) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 3 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 3 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 3) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 и содержащая цитозин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 3 содержит донорский нуклеотид (т.е. цитозин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP3 (т.е. цитозин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 3» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52 или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP3, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 3 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3), т.е. генотип «CC». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP3, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 3 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, гуанин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 3 (SNP3), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое

рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это тимин для SNP3, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP4» или «маркер SNP4» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 4 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP4, т.е. цитозина (C) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 4 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 4 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 4) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 и содержащая цитозин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 4 содержит донорский нуклеотид (т.е. цитозин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP4 (т.е. цитозин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 4» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52 или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP4, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 4 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4), т.е. генотип «CC». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент

интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP4, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 4 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, гуанин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 4 (SNP4), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это тимин для SNP4, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP5» или «маркер SNP5» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 5 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP5, т.е. гуанина (G) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 5 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 5) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 и содержащая гуанин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 5 содержит донорский нуклеотид (т.е. гуанин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP5 (т.е. гуанин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 5» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52 или 53.

Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP5, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 5 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5), т.е. генотип «GG». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP5, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 5 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, цитозин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 (SNP5), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это аденин для SNP5, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP6» или «маркер SNP6» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 6 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP6, т.е. тимина (T) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 6 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 6 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 6) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6 и содержащая тимин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 6 содержит донорский нуклеотид (т.е. тимин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*,

обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP6 (т.е. тимин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 6» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP6, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 6 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6), т.е. генотип «ТТ». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP6, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 6 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, цитозин или гуанин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 6 (SNP6), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это цитозин для SNP6, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

SEQ ID NO: 1 (содержащая SNP1), SEQ ID NO: 2 (содержащая SNP2), SEQ ID NO: 3 (содержащая SNP3), SEQ ID NO: 4 (содержащая SNP4), SEQ ID NO: 5 (содержащая SNP5) и SEQ ID NO: 6 (содержащая SNP6) физически связаны с QTL1.1, придающим устойчивость к CGMMV, на хромосоме 1 донора. Маркер SNP5 является наиболее тесно связанным. Таким образом, фрагмент интрогрессии,

придающий устойчивость к CGMMV, из *C. colocynthis*, содержит устойчивый донорский нуклеотид (и последовательность, содержащую донорский нуклеотид или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с такой последовательностью и содержащую донорский нуклеотид) для одного или нескольких или всех маркеров SNP из следующей группы: SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP5 и SNP6, более предпочтительно, он содержит устойчивый донорский нуклеотид для одного или нескольких или всех маркеров SNP, выбранных из группы: SNP4, SNP5 и SNP6, более предпочтительно он содержит донорский нуклеотид для SNP4 и/или SNP5 или для SNP5 и/или SNP6, еще более предпочтительно он содержит, по меньшей мере, устойчивый донорский нуклеотид для SNP5 (и, таким образом, SEQ ID NO: 5 или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51). Одним из аспектов изобретения являются растения, клетки и части растения культурного арбуза, содержащие такой фрагмент интрогрессии, предпочтительно в гомозиготной форме.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP7» или «маркер SNP7» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 7 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP7, т.е. тимина (Т) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 7 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 7 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 7) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7 и содержащая тимин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 7 содержит донорский нуклеотид (т.е. тимин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP7 (т.е. тимин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 7» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7 и содержащую донорский нуклеотид в

нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP7, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 7 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7), т.е. генотип «ТТ». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP7, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 7 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, цитозин или гуанин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 7 (SNP7), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это аденин для SNP7, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP8» или «маркер SNP8» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 8 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP8, т.е. цитозина (C) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 8 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 8 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 8) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8 и

содержащая цитозин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 8 содержит донорский нуклеотид (т.е. цитозин) в нуклеотиде 51. Таким образом, растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, содержат донорский нуклеотид для SNP8 (т.е. цитозин в нуклеотиде 51) или «содержат SEQ ID NO: 8» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP8, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 8 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8), т.е. генотип «CC». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP8, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 8 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, гуанин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 8 (SNP8), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это аденин для SNP8, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP9» или «маркер SNP9» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 9 или последовательности, содержащей, по

меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP9, т.е. аденина (A) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 9 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 9 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 9) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9 и содержащая аденин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 9 содержит донорский нуклеотид (т.е. аденин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP9 (т.е. аденин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 9» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP9, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 9 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9), т.е. генотип «AA». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP9, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 9 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть цитозин, гуанин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 9 (SNP9), т.е. последовательности

восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это гуанин для SNP9, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

SEQ ID NO: 7 (содержащая SNP7), SEQ ID NO: 8 (содержащая SNP8) и SEQ ID NO: 9 (содержащая SNP9) физически связаны с QTL4.1, придающим устойчивость к CGMMV, на хромосоме 4 донора. Маркер SNP8 является наиболее тесно связанным. Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения фрагмент интрогрессии, придающий устойчивость к CGMMV, из *C. colocynthis*, содержит устойчивый донорский нуклеотид (и последовательность, содержащую донорский нуклеотид или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с такой последовательностью и содержащую донорский нуклеотид) для одного или нескольких или всех маркеров SNP из следующей группы: SNP7, SNP8 и SNP9, более предпочтительно, он содержит устойчивый донорский нуклеотид для маркеров SNP, выбранных из группы: SNP7 и/или SNP8 или для SNP8 и/или SNP9, еще более предпочтительно он содержит, по меньшей мере, устойчивый донорский нуклеотид для SNP8 (и, таким образом, SEQ ID NO: 8 или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51). Одним из аспектов изобретения являются растения, клетки и части растения культурного арбуза, содержащие такой фрагмент интрогрессии, предпочтительно в гомозиготной форме.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP10» или «маркер SNP10» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 10 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP10, т.е. тимина (Т) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 10 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 10 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 10) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10 и содержащая тимин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 10 содержит

донорский нуклеотид (т.е. тимин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP10 (т.е. тимин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 10» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP10, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 10 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10), т.е. генотип «ТТ». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP10, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 10 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, цитозин или гуанин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 10 (SNP10), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это цитозин для SNP10, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP11» или «маркер SNP11» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 11 или последовательности,

содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP11, т.е. аденина (A) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 11 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 11 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 11) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11 и содержащая аденин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 11 содержит донорский нуклеотид (т.е. аденин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP11 (т.е. аденин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 11» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP11, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 11 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11), т.е. генотип «AA». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP11, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 11 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть цитозин, гуанин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 11 (SNP11), т.е.

последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это гуанин для SNP11, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP12» или «маркер SNP12» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 12 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP12, т.е. тимина (T) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 12 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 12 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 12) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12 и содержащая тимин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 12 содержит донорский нуклеотид (т.е. тимин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP12 (т.е. тимин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 12» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP12, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 12 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12), т.е. генотип «ТТ». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное

растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP12, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 12 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, цитозин или гуанин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 12 (SNP12), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это цитозин для SNP12, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

SEQ ID NO: 10 (содержащая SNP10), SEQ ID NO: 11 (содержащая SNP11) и SEQ ID NO: 12 (содержащая SNP12) связаны с QTL5.2, придающим устойчивость к CGMMV, на хромосоме 5 донора. Маркер SNP11 является наиболее тесно связанным. Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения фрагмент интрогрессии, придающий устойчивость к CGMMV, из *C. colocynthis*, содержит устойчивый донорский нуклеотид (и последовательность, содержащую донорский нуклеотид или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с такой последовательностью и содержащую донорский нуклеотид) для одного или нескольких или всех маркеров SNP из следующей группы: SNP10, SNP11 и SNP12, более предпочтительно, он содержит устойчивый донорский нуклеотид для маркеров SNP, выбранных из группы: SNP10 и/или SNP11 или для SNP11 и/или SNP12, еще более предпочтительно он содержит, по меньшей мере, устойчивый донорский нуклеотид для SNP11 (и, таким образом, SEQ ID NO: 11 или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51). Одним из аспектов изобретения являются растения, клетки и части растения культурного арбуза, содержащие такой фрагмент интрогрессии, предпочтительно в гомозиготной форме.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP13» или «маркер SNP13» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 13 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP13, т.е. аденина (A) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 13 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 13 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 13), или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13 и содержащая аденин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 13 содержит донорский нуклеотид (т.е. аденин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP13 (т.е. аденин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 13» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP13, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 13 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13), т.е. генотип «AA». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP13, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 13 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13). Другая хромосома, в которой отсутствует

фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть цитозин, гуанин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 13 (SNP13), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это гуанин для SNP13, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP14» или «маркер SNP14» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 14 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP14, т.е. аденина (A) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 14 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 14 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 14) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14 и содержащая аденин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 14 содержит донорский нуклеотид (т.е. аденин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP14 (т.е. аденин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 14» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP14, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 14 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере,

95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14), т.е. генотип «AA». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP14, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 14 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть цитозин, гуанин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 14 (SNP14), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это гуанин для SNP14, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP15» или «маркер SNP15» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 15 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP15, т.е. гуанина (G) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 15 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 15 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 15) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15 и содержащая гуанин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 15 содержит донорский нуклеотид (т.е. гуанин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP15 (т.е. гуанин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 15» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном

выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP15, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 15 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15), т.е. генотип «GG». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP15, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 15 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, цитозин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 15 (SNP15), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это аденин для SNP15, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP16» или «маркер SNP16» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 16 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP16, т.е. гуанина (G) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 16 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 16 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 16) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16 и содержащая гуанин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 16 содержит

донорский нуклеотид (т.е. гуанин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP16 (т.е. гуанин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 16» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP16, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 16 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16), т.е. генотип «GG». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP16, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 16 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, цитозин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 16 (SNP16), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это тимин для SNP16, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP17» или «маркер SNP17» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 17 или последовательности,

содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP17, т.е. тимина (Т) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 17 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 17 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 17) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17 и содержащая тимин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 17 содержит донорский нуклеотид (т.е. тимин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP17 (т.е. тимин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 17» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP17, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 17 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17), т.е. генотип «ТТ». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP17, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 17 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, цитозин или гуанин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 17 (SNP17), т.е.

последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это цитозин для SNP17, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP18» или «маркер SNP18» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 18 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP18, т.е. аденина (A) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 18 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 18 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 18) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18 и содержащая аденин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 18 содержит донорский нуклеотид (т.е. аденин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP18 (т.е. аденин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 18» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP18, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 18 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18), т.е. генотип «AA». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное

растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP18, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 18 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть цитозин, гуанин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 18 (SNP18), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это гуанин для SNP18, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

SEQ ID NO: 13 (содержащая SNP13), SEQ ID NO: 14 (содержащая SNP14), SEQ ID NO: 15 (содержащая SNP15), SEQ ID NO: 16 (содержащая SNP16), SEQ ID NO: 17 (содержащая SNP17) и SEQ ID NO: 18 (содержащая SNP18) физически связаны с QTL7.1, придающим устойчивость к CGMMV, на хромосоме 7 донора. Маркер SNP14 является наиболее тесно связанным. Таким образом, фрагмент интрогрессии, придающий устойчивость к CGMMV, из *C. colocynthis*, содержит устойчивый донорский нуклеотид (и последовательность, содержащую донорский нуклеотид или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с такой последовательностью и содержащую донорский нуклеотид) для одного или нескольких или всех маркеров SNP из следующей группы: SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18, более предпочтительно, он содержит устойчивый донорский нуклеотид для одного или нескольких или всех маркеров SNP, выбранных из группы: SNP13, SNP14 и SNP15, более предпочтительно он содержит донорский нуклеотид для SNP13 и/или SNP14 или для SNP14 и/или SNP15, еще более предпочтительно он содержит, по меньшей мере, устойчивый донорский нуклеотид для SNP14 (и, таким образом, SEQ ID NO: 14 или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51). Одним из аспектов изобретения являются растения, клетки и части

растения культурного арбуза, содержащие такой фрагмент интрогрессии, в гетерозиготной или в гомозиготной форме.

Также, в настоящем документе термин «SNP19» или «маркер SNP19» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 19 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP19, т.е. цитозина (C) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 19 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 19 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 19) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19 и содержащая цитозин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 19 содержит донорский нуклеотид (т.е. цитозин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP19 (т.е. цитозин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 19» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP19, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 19 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19), т.е. генотип «CC». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP19, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом

имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 19 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, гуанин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 19 (SNP19), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это тимин для SNP19, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP20» или «маркер SNP20» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 20 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP20, т.е. гуанина (G) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 20 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 20 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 20) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20 и содержащая гуанин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 20 содержит донорский нуклеотид (т.е. гуанин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP20 (т.е. гуанин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 20» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет

Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP20, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 20 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20), т.е. генотип «GG». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP20, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 20 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, цитозин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 20 (SNP20), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это цитозин для SNP20, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP21» или «маркер SNP21» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 21 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP21, т.е. гуанина (G) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 21 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 21 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 21) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21 и содержащая гуанин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 21 содержит донорский нуклеотид (т.е. гуанин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP21 (т.е. гуанин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID

NO: 21» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP21, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 21 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21), т.е. генотип «GG». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP21, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 21 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, цитозин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 21 (SNP21), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это аденин для SNP21, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин «SNP22» или «маркер SNP22» относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 22 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP22, т.е. цитозина (C) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 22 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 22 сама по себе (без

упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 22), или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22 и содержащая цитозин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 22 содержит донорский нуклеотид (т.е. цитозин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP22 (т.е. цитозин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 22» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP22, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 22 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22), т.е. генотип «CC». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP22, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 22 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, гуанин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 22 (SNP22), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это тимин для SNP22, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин “SNP23” или “маркер SNP23” относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 23 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP23, т.е. цитозина (C) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 23 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 23 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 23), или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23 и содержащая цитозин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 23 содержит донорский нуклеотид (т.е. цитозин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP23 (т.е. цитозин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 23» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP23, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 23 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23), т.е. генотип «СС». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP23, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 23 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23). Другая хромосома, в которой отсутствует

фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, гуанин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 23 (SNP23), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это тимин для SNP23, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

Таким образом, в настоящем документе термин “SNP24” или “маркер SNP24” относится к нуклеотиду 51 SEQ ID NO: 24 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24. Вместо упоминания донорского нуклеотида *C. colocynthis* для SNP24, т.е. гуанина (G) в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 24 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24, по тексту настоящего документа может упоминаться SEQ ID NO: 24 сама по себе (без упоминания нуклеотида в положении 51 SEQ ID NO: 24) или последовательность, содержащая, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO 24 и содержащая гуанин в нуклеотиде 51, так как SEQ ID NO: 24 содержит донорский нуклеотид (т.е. гуанин) в нуклеотиде 51. Таким образом, по тексту настоящего документа может быть указано, что растения или клетки растения, содержащие фрагмент интрогрессии, полученный из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, могут содержать донорский нуклеотид для SNP24 (т.е. гуанин в нуклеотиде 51) или могут «содержать SEQ ID NO: 24» или «последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24 и содержащую донорский нуклеотид в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении при попарном выравнивании». Эквивалентным положением при попарном выравнивании может быть немного другое положение, например, из-за вставок или удалений нуклеотидов, например, эквивалентным положением может быть нуклеотид 49, 50 или 52, или 53. Идентичность последовательности предпочтительно определяют путем попарного выравнивания, например, с помощью программы Needle (пакет Emboss). Когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP24, присутствует в гомозиготной форме, диплоидная клетка содержит две копии SEQ ID NO: 24 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере,

95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24), т.е. генотип «GG». Триплоидное растение или клетка будет содержать три копии, а тетраплоидное растение или клетка – четыре копии. Аналогичным образом, когда фрагмент интрогрессии, содержащий донорский нуклеотид для SNP24, присутствует в гетерозиготной форме (только одна хромосома из пары гомологичных хромосом имеет интрогрессию), диплоидная клетка содержит одну копию SEQ ID NO: 24 (или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24). Другая хромосома, в которой отсутствует фрагмент интрогрессии, содержит любой из других нуклеотидов, то есть аденин, цитозин или тимин, в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 24 (SNP24), т.е. последовательности восприимчивого рекуррентного родительского растения. Это зависит от того, какое рекуррентное родительское растение использовали. В соответствии с одним аспектом изобретения это тимин для SNP24, как указано в Таблице 1, как в рекуррентном родительском растении, используемом при обратном скрещивании в соответствии с настоящим документом.

SEQ ID NO: 19 (содержащая SNP19), SEQ ID NO: 20 (содержащая SNP20), SEQ ID NO: 21 (содержащая SNP21), SEQ ID NO: 22 (содержащая SNP22), SEQ ID NO: 23 (содержащая SNP23) и SEQ ID NO: 24 (содержащая SNP24) физически связаны с QTL9.1, придающим устойчивость к CGMMV, на хромосоме 9 донора. Маркер SNP22 является наиболее тесно связанным. Таким образом, фрагмент интрогрессии, придающий устойчивость к CGMMV, из *C. colocynthis*, содержит устойчивый донорский нуклеотид (и последовательность, содержащую донорский нуклеотид или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с такой последовательностью и содержащую донорский нуклеотид) для одного или нескольких или всех маркеров SNP из следующей группы: SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24, более предпочтительно, он содержит устойчивый донорский нуклеотид для одного или нескольких или всех маркеров SNP, выбранных из группы: SNP21, SNP22, SNP23, более предпочтительно он содержит донорский нуклеотид для SNP21 и/или SNP22 или для SNP22 и/или SNP23, еще более предпочтительно он содержит, по меньшей мере, устойчивый донорский нуклеотид для SNP22 (и, таким образом, SEQ ID NO: 22 или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22 и содержащую донорский нуклеотид в

нуклеотиде 51). Одним из аспектов изобретения являются растения, клетки и части растения культурного арбуза, содержащие такой фрагмент интрогрессии, в гетерозиготной или в гомозиготной форме.

В соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предоставляется растение, клетка или часть растения культурного арбуза, которые содержат фрагмент интрогрессии из хромосомы 7 и/или на хромосоме 9 растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, вида *Citrullus colocynthis*, при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 7 содержит QTL7.1 из растения-донора и последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, между SNP13 и SNP18, или между SNP13 и SNP17, или между SNP13 и SNP16, или между SNP13 и SNP15, или между SNP13 и SNP14, или между SNP14 и SNP15, или между SNP14 и SNP16, или между SNP14 и SNP17 или между SNP14 и SNP18; предпочтительно фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, между SNP13 и SNP15 или между SNP13 и SNP14 или между SNP14 и SNP15; и/или при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 9 содержит QTL9.1 из растения-донора и последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, между SNP19 и SNP24, или между SNP19 и SNP23, или между SNP19 и SNP22, или между SNP20 и SNP24, или между SNP20 и SNP23, или между SNP20 и SNP22, или между SNP21 и SNP24, или между SNP21 и SNP23, или между SNP21 и SNP22, или между SNP22 и SNP24, или между SNP22 и SNP23; предпочтительно фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, между SNP21 и SNP23, или между SNP21 и SNP22 или между SNP22 и SNP23.

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 могут происходить от донора, обладающего устойчивостью» т.е. могут иметь донорный нуклеотид, однако, изобретение также включает случай, когда ни один из двух SNP не происходит от донора, обладающего устойчивостью, и лишь хромосомная последовательность между двумя SNP происходит от донора и содержит QTL. Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения нуклеотиды маркера SNP, фланкирующие фрагмент интрогрессии, содержащий QTL, могут быть

частью фрагмента интрогрессии (получены от донора) или могут быть частью хромосомы реципиента (получены от реципиента).

Так, например, когда фрагмент интрогрессии из растения-донора “между SNP13 и SNP18”, SNP13 и/или SNP18 могут содержать донорский нуклеотид, однако, фрагмент интрогрессии может также иметь меньшую длину и содержать нуклеотид восприимчивого растения, например, нуклеотид рекуррентного родительского растения для SNP13 и/или SNP18. Например, от донора могут быть лишь последовательность и SNP, расположенные между SNP13 и SNP18, так, например, SNP14, SNP15, SNP16 и SNP17 могут быть от донора, или только SNP14, SNP15 и SNP16 могут быть от донора, или только один или два маркера SNP могут быть от донора, например, только один или два SNP14, SNP15 и SNP16. Следовательно, фрагмент интрогрессии, содержащий QTL, может не содержать все донорские нуклеотиды для SNP группы SNP13 - SNP18.

В соответствии с одним аспектом изобретения фрагмент интрогрессии содержит, по меньшей мере, один, при необходимости, по меньшей мере, два или все три донорских нуклеотида SNP13, SNP14 и/или SNP15, т.е. фрагмент интрогрессии содержит, по меньшей мере, одну, при необходимости, по меньшей мере, две или три последовательности из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 13 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13 и содержащую аденин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении), SEQ ID NO: 14 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14 и содержащую аденин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении) и/или SEQ ID NO: 15 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15 и содержащую гуанин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении). Очевидно, что фрагмент интрогрессии содержит QTL7.1 из донора, который придает устойчивость к CGMMV восприимчивому растению арбуза.

Аналогичным образом, например, когда фрагмент интрогрессии из растения-донора “между SNP19 и SNP24”, SNP19 и/или SNP24 могут содержать донорский нуклеотид, однако, фрагмент интрогрессии может также иметь меньшую длину и содержать нуклеотид восприимчивого растения, например, нуклеотид рекуррентного родительского растения для SNP19 и/или SNP24.

Например, от донора могут быть лишь последовательность и SNP, расположенные между SNP19 и SNP24, так, например, SNP20, SNP21, SNP22 и SNP23 могут быть от донора, или только SNP21, SNP22 и SNP23 могут быть от донора, или только один или два маркера SNP могут быть от донора, например, только один или два SNP21, SNP22 и SNP23. Следовательно, фрагмент интрогрессии, содержащий QTL, может не содержать все донорские нуклеотиды для SNP группы SNP19 – SNP24. В соответствии с одним аспектом изобретения фрагмент интрогрессии содержит, по меньшей мере, один, при необходимости, по меньшей мере, два или все три донорские нуклеотида SNP21, SNP22 и/или SNP23, т.е. фрагмент интрогрессии содержит, по меньшей мере, одну, при необходимости, по меньшей мере, две или три последовательности из следующих последовательностей: SEQ ID NO:21 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:21 и содержащую гуанин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении), SEQ ID NO: 22 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22 и содержащую цитозин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении) и/или SEQ ID NO: 23 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23 и содержащую цитозин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении). Очевидно, что фрагмент интрогрессии содержит QTL9.1 из донора, который придает устойчивость к CGMMV восприимчивому растению арбуза.

В соответствии с одним аспектом изобретением предоставляется культурное растение или часть или клетка растения арбуза, содержащие фрагмент интрогрессии из хромосомы 7 и/или на хромосоме 9 растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, вида *Citrullus colocynthis*, при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 7 содержит последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, для SNP14 (аденин в нуклеотиде 51 в SEQ ID NO: 14) или содержит SEQ ID NO: 14 или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14, и содержит аденин в нуклеотиде 51, и/или при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 9 содержит последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, для SNP22 (цитозин в нуклеотиде 51 в SEQ ID NO: 22) или содержит SEQ ID NO: 22 или последовательность, содержащую, по меньшей

мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:22, и содержит цитозин в нуклеотиде 51.

В соответствии с одним аспектом изобретением предоставляется культурное растение или часть или клетка растения арбуза, содержащие фрагмент интрогрессии из хромосомы 7 и/или на хромосоме 9 растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, вида *Citrullus colocynthis*, при этом указанный фрагмент интрогрессии на хромосоме 7 содержит QTL7.1 из растения-донора и содержит аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 13 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13, и/или аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 14 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 15 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:15, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 16 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:16, и/или тимин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 17 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17, и/или аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 18 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18; и предпочтительно указанный фрагмент интрогрессии на хромосоме 7 содержит аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 13 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13, и/или аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 14 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 15 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:15; и/или при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 9 содержит QTL9.1 из растения-донора и содержит цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 19 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 20 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 21 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности

последовательности с SEQ ID NO: 21, и/или цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 22 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и/или цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 23 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 24 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24; предпочтительно указанный фрагмент интрогрессии на хромосоме 9 содержит гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 21 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21, и/или цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 22 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и/или цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 23 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23.

Поскольку маркером, наиболее тесно связанным с QTL7.1, является SNP14, фрагмент интрогрессии предпочтительно содержит QTL7.1 и, по меньшей мере, один, два или все три донорских маркера, выбранных из SNP13, SNP14 и SNP15, т.е. аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 13 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13, и/или аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 14 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 15 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15.

Поскольку маркером, наиболее тесно связанным с QTL9.1, является SNP22, фрагмент интрогрессии предпочтительно содержит QTL9.1 и, по меньшей мере, один, два или все три донорских маркера, выбранных из SNP21, SNP22 и SNP23, т.е. гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 21 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21, и/или цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 22 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, и/или цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 23 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23.

Присутствует ли QTL, придающий устойчивость к CGMMV, на фрагменте интрогрессии, может быть определено фенотипически, с использованием теста устойчивости к CGMMV в соответствии с описанием, приведенным в настоящем документе, в разделе «Примеры». Таким образом, например, может осуществляться скрещивание растения, содержащего один или несколько донорских нуклеотидов для любого из описанных SNP, с восприимчивым растением, а затем осуществляется анализ полученного потомства (например, F1) на устойчивость к CGMMV. QTL7.1 и QTL9.1 являются доминантными, таким образом, этот фенотип наблюдается уже у потомка F1. Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к самим растениям и клеткам растений, содержащим QTL7.1 или QTL9.1, а также к растениям, содержащим оба QTL в геноме, т.е. к растениям, содержащим две рекомбинантные хромосомы: одну рекомбинантную хромосому 7, содержащую фрагмент интрогрессии из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, и одну рекомбинантную хромосому 9, содержащую фрагмент интрогрессии из растения-донора *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, предпочтительно из одного и того же растения-донора *C. colocynthis* (но не обязательно, они также могут быть из различных доноров).

Растения культурного арбуза, содержащие QTL7.1 и/или QTL9.1, обладают устойчивостью к CGMMV, предпочтительно степень выраженности симптомов CGMMV у таких растений составляет 3 балла по указанной шкале, более предпочтительно – 4 балла (отсутствие симптомов) при тестировании в соответствии с описанием. Предпочтительно растения или прививочные черенки, полученные из таких растений, имеют чрезвычайно низкие уровни вируса CGMMV в листьях и, в некоторых случаях, в плодах – значительно ниже по сравнению с восприимчивыми контрольными растениями, которые выращивали в аналогичных условиях. В соответствии с одним аспектом изобретения семена, полученные из плодов таких растений, не содержат вируса CGMMV.

Культурное растение или клетка растения арбуза по изобретению содержит фрагмент интрогрессии на хромосоме 7 в гомозиготной или в гетерозиготной форме и/или содержит фрагмент интрогрессии на хромосоме 9, который присутствует в гомозиготной или гетерозиготной форме. Получение гибридных сортов F1 осуществляют наиболее простым образом, если фрагменты интрогрессии

присутствуют в инбредных родительских линиях в гомозиготной форме. В таком случае гибрид F1, полученный путем скрещивания двух гомозиготных инбредных линий, содержит QTL также в гомозиготной форме.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к растениям или к клеткам (или к частям) растений культурного арбуза, содержащим фрагмент интрогрессии из хромосомы 1 (содержащий QTL1.1 из донора), хромосомы 4 (содержащий QTL4.1), хромосомы 5 (содержащий QTL5.2), хромосомы 7 (содержащий QTL7.1) и/или хромосомы 9 (содержащий QTL9.1) растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, при этом фрагмент интрогрессии придает устойчивость к CGMMV, и фрагмент интрогрессии может быть идентифицирован по генотипу SNP растения-донора (содержит генотип SNP растения-донора) для одного или нескольких (или для всех) следующих SNP: SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP5 и/или SNP6 для фрагмента на хромосоме 1; и/или одного или нескольких SNP из SNP7, SNP8 и/или SNP9 для фрагмента на хромосоме 4; и/или одного или нескольких SNP из SNP10, SNP11 и/или SNP12 для фрагмента на хромосоме 5; и/или одного или нескольких SNP из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и/или SNP18 для фрагмента на хромосоме 7; и/или одного или нескольких SNP из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и/или SNP24 для фрагмента на хромосоме 9. QTL, придающий устойчивость к CGMMV, присутствует на фрагменте интрогрессии, что может быть определено с помощью анализа устойчивости к CGMMV в соответствии с описанием, например, в разделе «Примеры».

Растение культурного арбуза, содержащее фрагмент интрогрессии из хромосомы 7 (содержащий QTL7.1) и/или из хромосомы 9 (содержащий QTL9.1), в соответствии с описанием выше, может, при необходимости, также содержать один или несколько QTL, выбранных из QTL1.1, QTL4.1 и/или QTL5.2.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящим изобретением предоставляется растение, клетка или часть растения культурного арбуза, которые содержат фрагмент интрогрессии из хромосомы 1 и/или на хромосоме 4 и/или хромосоме 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, вида *Citrullus colocynthis*, при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 1 содержит QTL1.1 из растения-донора и последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, между SNP1 и SNP6, или между SNP1 и SNP5, или

между SNP1 и SNP4, или между SNP2 и SNP6, или между SNP2 и SNP5, или между SNP2 и SNP4, или между SNP3 и SNP6, или между SNP3 и SNP5 или между SNP3 и SNP4, или между SNP4 и SNP6, или между SNP4 и SNP5 или между SNP5 и SNP6; предпочтительно фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, между SNP4 и SNP6, или между SNP4 и SNP5 или между SNP5 и SNP6;; и/или при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 4 содержит QTL4.1 из растения-донора и последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, между SNP7 и SNP9, или между SNP8 и SNP8, или между SNP7 и SNP8; и/или при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 5 содержит QTL5.2 из растения-донора и последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, между SNP10 и SNP12, или между SNP10 и SNP11, или между SNP11 и SNP12.

Предпочтительно эти фрагменты интрогрессии, содержащие QTL1.1, QTL4.1 или QTL5.2, присутствуют в растении в гомозиготной форме. Кроме того, они могут присутствовать в растении культурного арбуза по отдельности или в различных комбинациях, например, QTL1.1 и QTL4.1 или QTL1.1, и QTL5.2 или QTL4.1, и QTL5.2, или все три вместе. Как было указано, в некоторых случаях оба QTL из QTL7.1 и QTL9.1 или один из них могут присутствовать в одном растении в сочетании с одним или несколькими из рецессивных QTL.

Когда указано, что фрагмент интрогрессии из растения-донора находится «между SNP1 и SNP6», например, SNP1 и/или SNP6 могут содержать донорский нуклеотид, однако, фрагмент интрогрессии может также иметь меньшую длину и содержать нуклеотид восприимчивого растения, например, нуклеотид рекуррентного родительского растения для SNP1 и/или SNP6. Например, от донора могут быть лишь последовательность и SNP, расположенные между SNP1 и SNP6, так, например, SNP2, SNP3, SNP4 и SNP5 могут быть от донора, или только SNP3, SNP4 и SNP5 могут быть от донора, или только один или два маркера SNP могут быть от донора, например, только один или два SNP3, SNP4 и SNP5. Следовательно, фрагмент интрогрессии, содержащий QTL, может не содержать все донорские нуклеотиды для SNP группы SNP1 – SNP6.

В соответствии с одним аспектом изобретения фрагмент интрогрессии, содержащий QTL1.1, содержит, по меньшей мере, один, при необходимости, по меньшей мере, два или все три донорских нуклеотида SNP4, SNP5 и/или SNP6, т.е.

фрагмент интрогрессии содержит, по меньшей мере, одну, при необходимости, по меньшей мере, две или три последовательности SEQ ID NO:4 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:4 и содержащую цитозин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении), SEQ ID NO:5 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:5 и содержащую гуанин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении) и/или SEQ ID NO:6 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6 и содержащую тимин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении). Очевидно, что фрагмент интрогрессии содержит QTL1.1 из донора, который придает устойчивость к CGMMV восприимчивому растению арбуза.

Аналогичным образом, например, когда фрагмент интрогрессии, содержащий QTL4.1, из растения-донора находится между SNP7 и SNP9”, SNP7 и/или SNP9 могут содержать донорский нуклеотид, однако, фрагмент интрогрессии может также иметь меньшую длину и содержать нуклеотид восприимчивого растения, например, нуклеотид рекуррентного родительского растения для SNP7 и/или SNP9. Например, от донора могут быть лишь последовательность и SNP, расположенные между SNP7 и SNP9, так, например, от донора может быть только SNP8. Следовательно, фрагмент интрогрессии, содержащий QTL4.1, может не содержать все донорские нуклеотиды для SNP группы SNP7 – SNP9. В соответствии с одним аспектом изобретения фрагмент интрогрессии содержит, по меньшей мере, один, при необходимости, по меньшей мере, два или все три донорских нуклеотида SNP7, SNP8 и/или SNP9, т.е. фрагмент интрогрессии содержит, по меньшей мере, одну, при необходимости, по меньшей мере, две или три последовательности из следующих последовательностей: SEQ ID NO:7 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:7 и содержащую тимин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении), SEQ ID NO:8 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:8 и содержащую цитозин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении) и/или SEQ ID NO: 9 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9 и содержащую аденин в

нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении). Очевидно, что фрагмент интрогрессии содержит QTL4.1 из донора, который придает устойчивость к CGMMV восприимчивому растению арбуза.

Аналогичным образом, например, когда фрагмент интрогрессии, содержащий QTL5.2, из растения-донора находится между “между SNP10 и SNP12”, SNP10 и/или SNP12 могут содержать донорский нуклеотид, однако, фрагмент интрогрессии может также иметь меньшую длину и содержать нуклеотид восприимчивого растения, например, нуклеотид рекуррентного родительского растения для SNP10 и/или SNP12. Например, от донора могут быть лишь последовательность и SNP, расположенные между SNP10 и SNP12, так, например, от донора может быть только SNP11. Следовательно, фрагмент интрогрессии, содержащий QTL5.2, может не содержать все донорские нуклеотиды для SNP группы SNP10 – SNP12. В соответствии с одним аспектом изобретения фрагмент интрогрессии содержит, по меньшей мере, один, при необходимости, по меньшей мере, два или все три донорских нуклеотида SNP10, SNP11 и/или SNP12, т.е. фрагмент интрогрессии содержит, по меньшей мере, одну, при необходимости, по меньшей мере, две или три последовательности из следующих последовательностей: SEQ ID NO:10 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10 и содержащую тимин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении), SEQ ID NO: 11 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11 и содержащую аденин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении) и/или SEQ ID NO: 12 (или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12 и содержащую тимин в нуклеотиде 51 или в эквивалентном положении). Очевидно, что фрагмент интрогрессии содержит QTL5.2 из донора, который придает устойчивость к CGMMV восприимчивому растению арбуза.

В соответствии с одним аспектом изобретением предоставляется растение или часть или клетка растения культурного арбуза, содержащие фрагмент интрогрессии из хромосомы 1 (содержащий QTL1.1) и/или на хромосоме 4 (содержащий QTL4.1) и/или из хромосомы 5 (содержащий QTL5.2) растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, вида *Citrullus colocynthis*, при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 1 содержит последовательность

растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, для SNP5 (гуанин в нуклеотиде 51 в SEQ ID NO: 5) или содержит SEQ ID NO: 5 или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, и содержит гуанин в нуклеотиде 51, и/или при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 4 содержит последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, для SNP8 (цитозин в нуклеотиде 51 в SEQ ID NO: 22) или содержит SEQ ID NO: 8 или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, и содержит цитозин в нуклеотиде 51; и/или при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 5 содержит последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, для SNP11 (аденин в нуклеотиде 51 в SEQ ID NO: 11) или содержит SEQ ID NO: 11 или последовательность, содержащую, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и содержит цитозин в нуклеотиде 51.

В соответствии с одним аспектом изобретением предоставляется культурное растение или часть или клетка растения арбуза, содержащие фрагмент интрогрессии из хромосомы 1 и/или на хромосоме 4 и/или на хромосоме 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, вида *Citrullus colocynthis*, при этом указанный фрагмент интрогрессии на хромосоме 1 содержит QTL1.1 из растения-донора и содержит нуклеотид в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 1 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 2 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, и/или цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 3 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, и/или цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 4 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, и/или тимин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 6 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6; предпочтительно указанный фрагмент интрогрессии на хромосоме 1 содержит цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 4 или

последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, и/или тимин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 6 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6; и при этом указанный фрагмент интрогрессии на хромосоме 4 содержит QTL4.1 из растения-донора и содержит тимин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 7 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7, и/или цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 8 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, и/или аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 9 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9; и при этом указанный фрагмент интрогрессии на хромосоме 5 содержит QTL5.1 из растения-донора и содержит тимин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 10 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, и/или аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 11 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и/или тимин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 12 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

Поскольку маркером, наиболее тесно связанным с QTL1.1 is SNP5, фрагмент интрогрессии предпочтительно содержит QTL1.1 и, по меньшей мере, один, два или все три донорских маркера, выбранных из SNP4, SNP5 и SNP6, т.е. цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 4 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 5 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, и/или тимин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 6 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6.

Поскольку маркером, наиболее тесно связанным с QTL4.1, является SNP8, фрагмент интрогрессии предпочтительно содержит QTL4.1 и, по меньшей мере, один, два или все три донорских маркера, выбранных из SNP7, SNP8 и SNP9, т.е.

тимин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 7 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 7, и/или цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 8 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8, и/или аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 9 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9.

Поскольку маркером, наиболее тесно связанным с QTL5.2 является SNP11, фрагмент интрогрессии предпочтительно содержит QTL5.2 и, по меньшей мере, один, два или все три донорских маркера, выбранных из SNP10, SNP11 и SNP12, т.е. тимин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 10 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, и/или аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 11 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11, и/или тимин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 12 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

Как было указано, в соответствии с одним аспектом изобретения культурное растение арбуза или клетка растения арбуза содержат фрагмент(-ы) интрогрессии из образца *Citrullus colocynthis*. Таким образом может быть любой образец *C. colocynthis*, обладающий устойчивостью к CGMMV, в частности, степень выраженности симптомов CGMMV у такого образца составляет 4 балла по указанной шкале (отсутствие симптомов) после инокуляции CGMMV в соответствии с описанием. Несмотря на то, что в соответствии с одним аспектом изобретения фрагменты интрогрессии присутствуют в/могут быть получены из NCIMB 42624, донорским растением *C. colocynthis* не обязательно является образец, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624 (или его потомство). Например, специалист сможет идентифицировать любой другой образец *C. colocynthis*, степень выраженности симптомов CGMMV у которого составляет 4 балла по указанной шкале (отсутствие симптомов) и/или который содержит профиль маркеров SNP идентичный или в высокой степени схожий с NCIMB 42624 по любым из QTL, что означает, что у такого донора присутствует тот же QTL или те же QTL (выбранные из QTL1.1, QTL4.1, QTL5.2, QTL7.1 и QTL9.1). Такой образец *C. colocynthis* не обязательно должен иметь генотип SNP полностью идентичный NCIMB 42624. Например, такой образец может быть гетерозиготным

по некоторым маркерам SNP, и для селекции его потомства, гомозиготного по одному или нескольким или всем QTL, потребуется его самоопыление один или несколько раз. Кроме того, может варьироваться генотип SNP донора, например, по QTL7.1 или QTL9.1 он может содержать пять, четыре или три донорских маркера SNP из SNP13 - SNP18 (связанных с QTL7.1) или из SNP19 - SNP24 (связанных с QTL9.1).

Примерами образцов *C. colocynthis*, которые могут содержать устойчивость к CGMMV (т.е. один или несколько QTL из QTL1.1, QTL4.1, QTL5.2, QTL7.1 и QTL9.1) являются образцы растений, степень выраженности симптомов у которых составляет 4 балла по указанной шкале (отсутствие симптомов). Такие образцы или потомки отобранных отдельных растений, полученные путем самоопыления, степень выраженности симптомов у которых составляет 4 балла, могут тестироваться на генотип маркеров SNP, представленных в Таблице 1 и Таблице 6 в настоящем документе. Следует отметить, что, очевидно, такие образцы сами по себе не входят в объем изобретения, поскольку, как правило, они обычно дают маленькие плоды с белой мякотью с низким содержанием сухих веществ (2 или 3° по шкале Брикса) и не имеют агрономической ценности; в объем настоящего изобретения входят лишь QTL, которые перенесены (интрогрессированы) по отдельности или в комбинации в сельскохозяйственные культуры, такие как культурный арбуз, для придания устойчивости к CGMMV растениям культурного арбуза с хорошими агрономическими свойствами (высокое содержание сухих веществ, высокое качество плодов и высокая урожайность плодов).

В соответствии с одним аспектом изобретения фрагменты интрогрессии получены из растения-донора *Citrullus colocynthis*, репрезентативный образец семян которого, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из потомства такого растения.

Любой из пяти QTL, идентифицированных в настоящем изобретении, можно перенести от растения-донора *C. colocynthis* к культурным растениям арбуза, по отдельности или в различных комбинациях. Желательно, чтобы растение содержало, по меньшей мере, один доминантный QTL: QTL7.1 и/или QTL9.1. Однако рецессивные QTL, имеющие меньшее значение, QTL1.1, QTL4.1 и/или QTL5.2 также могут быть использованы, например, для дополнительного уменьшения титра вируса в инокулированных растениях или для снижения титра

вируса CGMMV до уровней ниже порога обнаружения путем ОТ-кПЦР и/или для того, чтобы растения и части растений стали незаразными, и/или для того, чтобы передача вируса семенам стала невозможной, и/или для придания иммунитета. Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретением предоставляется культурное растение арбуза, содержащее QTL7.1 и/или QTL9.1, а также содержащее один или несколько QTL из QTL1.1, QTL4.1 и QTL5.2, предпочтительно в гомозиготной форме, поскольку они являются рецессивными.

В соответствии с одним аспектом изобретения культурные растения арбуза являются диплоидными растениями. В соответствии с еще одним аспектом изобретения такие растения являются тетраплоидными. В соответствии с еще одним аспектом изобретения такие растения представляют собой триплоидные растения, в частности, полученные путем опыления тетраплоидной инбредной родительской линии (предпочтительно содержащей четыре копии фрагмента(-ов) интрогрессии и маркеров SNP на фрагментах интрогрессии, например, четыре копии QTL7.1 и/или QTL9.1) с использованием пыльцы диплоидной инбредной родительской линии (предпочтительно, содержащей две копии фрагмента(-ов) интрогрессии, например, две копии QTL7.1 и/или QTL9.1), для получения триплоидных гибридных растений F₁, содержащих три копии фрагмента интрогрессии, например, три копии QTL7.1 и/или QTL9.1.

Присутствует ли нуклеотид маркера SNP, например, донорский нуклеотид, в диплоидной, триплоидной или тетраплоидной форме, можно обнаружить с помощью анализа генотипирования, например, путем KASP-анализа. Так, например, растение, часть или клетка растения (или полученная из них ДНК), содержащие две копии фрагмента интрогрессии, который содержит донорский нуклеотид для SNP14, будут иметь генотип «АА», тогда как растение, часть или растения, содержащие три копии будут иметь генотип «ААА», а растение, часть или клетка растения, содержащие четыре копии, будут иметь генотип «АААА». Такие анализы генотипирования SNP для определения того, содержит ли растение, часть или клетка растения один или несколько QTL, придающих устойчивости к CGMMV по изобретению, с использованием одного или нескольких маркеров SNP, предусмотренных настоящим изобретением, также являются аспектом изобретения.

Культурное растение часть или клетка растения арбуза по настоящему изобретению предпочтительно обладают устойчивостью к CGMMV, составляющей в среднем 3 балла (слабо выраженные симптомы) или 4 балла (отсутствие симптомов).

В соответствии с одним аспектом изобретения культурное растение или клетка растения арбуза по изобретению представляет собой инбредное растение или инбредную клетку растения, или гибридное растение F1, или клетку растения F1, или диплоидное или тетраплоидное, или триплоидное растение, или клетку растения.

Кроме того, в объем настоящего изобретения входят семена, из которых можно вырастить растение по изобретению в соответствии с описанием в настоящем документе.

Аналогичным образом, в объем настоящего изобретения входят плод или часть плода культурного растения арбуза, содержащие клетки растения по настоящему изобретению.

Кроме того, один из вариантов осуществления изобретения относится к материалу для размножения культурного растения арбуза, содержащему клетки культурного растения арбуза по настоящему изобретению.

Частями растений по изобретению также являются отростки, прививочные черенки, подвой, привитые сеянцы или растения, содержащие прививочный черенок и/или подвой растения по изобретению, листья, плоды, части плодов, семена, части семян, клетки, культуры тканей, цветы, пыльца, зародыши, корни и т.д.

В соответствии с одним аспектом изобретения предоставляется способ получения триплоидных гибридных семян культурного арбуза, включающий следующие этапы:

- а) получение первого инбредного диплоидного растения арбуза, обладающего устойчивостью к CGMMV, содержащего две хромосомы 7, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 7 устойчивого к CGMMV растения-донора вида *Citrullus colocynthis*, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL7.1 и последовательность растения-донора для SNP14 (SEQ ID NO: 14), или

между SNP13 и SNP18, или между SNP13 и SNP15; или фрагмент интрогрессии содержит QTL7.1 и нуклеотид обладающего устойчивостью растения-донора для одного или нескольких или всех из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18;

- b) получение второго инбредного тетраплоидного растения арбуза, обладающего устойчивостью к CGMMV, содержащего четыре хромосомы 7, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 7 устойчивого к CGMMV растения-донора вида *Citrullus colocynthis*, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL7.1 и последовательность растения-донора для SNP14 (SEQ ID NO: 14), или между SNP13 и SNP18, или между SNP13 и SNP15; или фрагмент интрогрессии содержит QTL7.1 и генотип обладающего устойчивостью растения-донора для одного или нескольких или всех из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18;
- c) опыление тетраплоидного растения арбуза, полученного на этапе b), с использованием пыльцы диплоидного растения арбуза, полученного на этапе a); и
- d) сбор семян из плодов, полученных на этапе c).

Также, предоставляется способ получения триплоидных гибридных семян культурного арбуза, включающий следующие этапы:

- a) получение первого инбредного диплоидного растения арбуза, обладающего устойчивостью к CGMMV, содержащего две хромосомы 9, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 9 устойчивого к CGMMV растения-донора вида *Citrullus colocynthis*, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL9.1 и последовательность растения-донора для SNP22 (SEQ ID NO: 22), или между SNP19 и SNP24, или между SNP21 и SNP23; или фрагмент интрогрессии содержит QTL9.1 и генотип обладающего устойчивостью растения-донора для одного или нескольких или всех из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24;
- b) получение второго инбредного тетраплоидного растения арбуза, обладающего устойчивостью к CGMMV, содержащего четыре

хромосомы 9, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 9 устойчивого к CGMMV растения-донора вида *Citrullus colocynthis*, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL9.1 и последовательность растения-донора для SNP22 (SEQ ID NO: 22), или между SNP19 и SNP24, или между SNP21 и SNP23; или фрагмент интрогрессии содержит QTL9.1 и генотип обладающего устойчивостью растения-донора для одного или нескольких или всех из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24;

- c) опыление тетраплоидного растения арбуза, полученного на этапе b), с использованием пыльцы диплоидного растения арбуза, полученного на этапе a); и
- d) сбор семян из плодов, полученных на этапе c).

Вышеуказанные два способа также могут быть использованы для получения триплоидных растений арбуза (и семян, из которых можно вырастить такие растения), содержащих три копии QTL7.1 и три копии QTL9.1. В таком случае растение по п. а) содержит две копии QTL7.1 и QTL9.1, и растение по п. б) содержит четыре копии QTL7.1 и QTL9.1.

Семена, собранные на этапе d), также являются аспектом изобретения, как и растения, выращенные из этих семян, а также части растений и клетки таких растений. Например, аспектом изобретения являются триплоидные плоды, содержащие три копии QTL7.1 и/или QTL9.1.

В соответствии с одним аспектом изобретением предоставляется применение одного или нескольких маркеров SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18 и/или одного или нескольких маркеров SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24 для идентификации растения или части растения, или клетки растения арбуза, обладающих устойчивостью к CGMMV.

В соответствии с еще одним аспектом изобретением предоставляется применение одного или нескольких маркеров SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18 и/или одного или нескольких маркеров SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24 для интрогрессии характеристики устойчивости к CGMMV в культурное растение арбуза, восприимчивое к CGMMV.

В соответствии с еще одним аспектом изобретением предоставляется применение одного или нескольких маркеров SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP5, и SNP6 и/или одного или нескольких маркеров SNP7, SNP8 и SNP9 и/или одного или нескольких маркеров SNP10, SNP11 и SNP12 для идентификации растения или части растения, или клетки растения арбуза, обладающих устойчивостью к CGMMV.

В соответствии с еще одним аспектом изобретением предоставляется применение одного или нескольких маркеров SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP5, и SNP6 и/или одного или нескольких маркеров SNP7, SNP8 и SNP9 и/или одного или нескольких маркеров SNP10, SNP11 и SNP12 для интрогрессии характеристики устойчивости к CGMMV в культурное растение арбуза, восприимчивое к CGMMV.

Кроме того, в объем настоящего изобретения входит способ скрининга одного или нескольких растений *Citrullus* или частей растения *Citrullus* или полученных из них ДНК на наличие фрагмента на хромосоме 7 и/или 9, придающего устойчивость к CGMMV, включающий следующие этапы:

- а) скрининг геномной ДНК на генотип SNP одного или нескольких или всех маркеров из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18 и/или для одного или нескольких из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24; и, при необходимости,
- б) отбор растений или частей растений, которые содержат устойчивый донорский нуклеотид для одного или нескольких или всех из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18 и/или для одного или нескольких или всех из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24.

Кроме того, в объем настоящего изобретения входит способ скрининга одного или нескольких растений *Citrullus* или частей растения *Citrullus* или полученных из них ДНК на наличие фрагмента на хромосоме 1 и/или 4 и/или 5, придающего устойчивость к CGMMV, включающий следующие этапы:

- а) скрининг геномной ДНК на генотип SNP одного или нескольких или всех маркеров из SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP5 и SNP6 и/или одного или нескольких или всех маркеров из SNP7, SNP8 и SNP9 и/или одного или нескольких или всех маркеров из SNP10, SNP11 и SNP12; и, при необходимости,

- б) отбор растений или частей растений, которые содержат устойчивый донорский нуклеотид для одного или нескольких или всех маркеров из SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP5 и SNP6 и/или для одного или нескольких или всех маркеров из SNP7, SNP8 и SNP9 и/или для одного или нескольких или всех маркеров из SNP10, SNP11 и SNP12.

Очевидно, что методы скрининга могут комбинироваться в один метод скрининга для выявления присутствия фрагмента, придающего устойчивость к CGMMV, на хромосоме 1, 4, 5, 7 и/или 9.

В соответствии с одним аспектом изобретения растения или части растения *Citrullus* или ДНК представляют собой растения или части растений, или ДНК *Citrullus colocynthis*, такие как образцы PI (внесенные в банк семян Министерства сельского хозяйства США), которые потенциально содержат один или несколько QTL в соответствии с описанием в настоящем документе. Например, с использованием такого способа может осуществляться скрининг образцов PI, внесенных в банк семян USDA GRIN Министерства сельского хозяйства США. При необходимости, тестирование растения на устойчивость к CGMMV, может осуществляться, например, в соответствии с описанием, приведенным по тексту настоящего документа и в разделе «Примеры». Такое тестирование может осуществляться до скрининга маркеров SNP (например, чтобы скрининг осуществляли лишь для растений со степенью выраженности симптомов CGMMV, составляющей 3 или 4 балла) и/или после скрининга маркеров, например, после этапа б), для проверки того, обладает ли отобранное растение или часть растения устойчивостью к CGMMV.

В соответствии с еще одним аспектом растения *Citrullus*, части растений или ДНК представляют собой растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*, например, сотра, инбредные линии, линии скрещивания, диплоидные, триплоидные, тетраплоидные растения и т.д., которые подвергают скринингу для проверки того, содержат ли они один или несколько фрагментов интрогрессии в гетерозиготной или гомозиготной форме, или несколько рекомбинантных хромосом, содержащих такие фрагмент(-ы) интрогрессии.

Такая часть растения может быть любой частью, содержащей клетки растения (или полученную из них ДНК), например, листом или частью листа,

семенем, оболочкой семени, зародышем, пыльцой, цветами, семязачатками, корнями, стеблями, плодом, частью плодов, клетками и т.д.

Частью растения, для которой осуществляют скрининг на генотип маркера SNP, также может являться оболочка семян, поскольку оболочка семян содержит материнскую ДНК. Таким образом, когда осуществляют скрининг оболочки семени гибрида F1, и результаты сравнивают с генотипом самого гибрида F1, можно сделать заключение о генотипе родительской линии мужского пола. Таким образом, можно определить присутствие одного или нескольких фрагментов интрогрессии по изобретению в родительских линиях гибрида.

Скрининг маркеров может осуществляться с использованием различных методов, например, могут быть использованы 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).

Например, маркеры SNP могут быть обнаружены путем KASP-анализа (см. www.kpbioscience.co.uk) или других видов анализа. Для описанных в настоящем документе SNP может быть разработан KASP-анализ. 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, 1086-1099, в частности, p097-098 для KASP для метода KASP-анализа).

Кроме того, настоящим изобретением предоставляется способ выращивания любого культурного растения арбуза по изобретению на территории, зараженной CGMMV.

Кроме того, настоящим изобретением предоставляется способ селекции культурного растения арбуза, содержащего фрагмент интрогрессии из растения-донора *C. colocynthis* в соответствии с описанием (например, содержащего QTL7 и/или QTL9), при этом указанный способ включает следующие этапы:

- а) получение популяции растений арбуза, полученной путем скрещивания растения арбуза (например, растения, восприимчивого к CGMMV) и растения *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к

CGMMV, такого как растение NCIMB 42624, или его потомства (например, потомства, полученного путем самоопыления) или растения арбуза, обладающего устойчивостью к CGMMV, например, растения из линии или сорта, содержащего один или несколько фрагментов интрогрессии из растения *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV (содержащего, например, QTL7.1 и/или QTL9.1),

- b) отбор растения из этой популяции, которое содержит один или несколько фрагментов интрогрессии из растения-донора *C. colocynthis*, причем этот фрагмент интрогрессии содержит QTL, выбранный из следующей группы: QTL1.1, QTL4.1, QTL5.2, QTL7.1 и/или QTL9.1 в соответствии с описанием в настоящем документе.

Такой популяцией растений может быть, например, популяция F2 или F3 или популяция, полученной путем обратным скрещиванием, инбредная популяция (например, рекомбинантные инбредные линии) или любая другая популяция, содержащая одну или несколько рекомбинантных хромосом, то есть хромосом, содержащих фрагменты растения-донора *C. colocynthis*, в частности, рекомбинантную хромосому 1, содержащую QTL1.1, и/или рекомбинантную хромосому 4, содержащую QTL4.1, и/или рекомбинантную хромосому 5, содержащую QTL5.2, и/или рекомбинантную хромосому 7, содержащую QTL7.1, и/или рекомбинантную хромосому 9, содержащую QTL9.1.

Отбор может осуществляться любым способом, описанным в настоящем документе, например, путем генотипирования SNP для одного или нескольких маркеров SNP, связанных с QTL, путем секвенирования, путем тестирования устойчивости к CGMMV и т.д.

Отобранное растение содержит, по меньшей мере, один из QTL по изобретению, а также является одним из вариантов осуществления изобретения.

Еще один из вариантов осуществления изобретения относится к генетически немодифицированным растениям или клеткам растения *Citrullus* (например, к диплоидным, триплоидным или тетраплоидным растениям или клеткам растения, или растениям или клеткам растения с другой ploидностью), а также к семенам, из которых можно вырастить или получить и идентифицировать или отобрать любые

растения, описанные в настоящем документе, любыми вышеописанными способами.

Еще один из вариантов осуществления изобретения относится к частям растений, таким как прививочные черенки, побеги, листья, цветы, отростки, корни, плоды, части плодов, пыльца, семязачатки и семена, которые получены или можно получить из растений по настоящему изобретению.

Получение и культивация бессемянных растений арбуза широко распространено и известно специалистам. Обычные арбузные растения диплоидны ($2n$). Арбузы, дающие бессемянные плоды – это растения, полученные скрещиванием диплоидного ($2n$) мужского арбуза с тетраплоидным ($4n$) женским арбузом. Полученные семена F1 являются триплоидными ($3n$), из них могут быть выращены триплоидные ($3n$) растения F1. Для начала завязывания плодов на растениях F1 требуется опыление. Из-за того, что триплоидные ($3n$) растения F1 не производят фертильную пыльцу, на одном поле с ними должны выращиваться так называемые растения-опылители. Растения-опылители являются диплоидными ($2n$). Как правило, для получения достаточного количества пыльцы для опыления в этой схеме должно быть обеспечено отношение опылителей к триплоидным ($3n$) растениям, равное примерно 1:3. Перекрестное опыление между диплоидным ($2n$) опылителем и цветками женского триплоидного ($3n$) растения приводит к завязыванию плодов, после чего на триплоидном растении F1 происходит образование бессемянных триплоидных ($3n$) плодов. Диплоидные ($2n$) и тетраплоидные ($4n$) родители растений F1 дают плоды с семенами, и такие растения могут размножаться независимо друг от друга путем самоопыления.

Были получены специализированные растения-опылители, которые обычно представляют собой компактные растения (чтобы они не конкурировали с триплоидными растениями), которые дают несъедобные и/или нетоварные плоды малого размера с рисунком на кожуре, который позволяет их легко отличить от плодов триплоидных ($3n$) растений в ходе сбора урожая. Выбор того, будут ли использоваться растения-опылители двойного назначения с съедобными и/или пригодными для продажи плодами или специализированные растения-опылители с несъедобными и/или нетоварными плодами, зависит от того, сможет ли производитель реализовать на рынке или использовать плоды с семенами

соответствующего растения-опылителя. Выбор опылителя влияет на урожайность. (McGregor & Waters, 2014, HortScience 49(6), 714-721).

Некоторые растения-опылители дают диплоидные плоды, которые можно реализовать на рынке, в то время как другие растения-опылители дают плоды, которые невозможно употреблять в пищу и/или нельзя реализовать на рынке. Растения-опылители, которые дают плоды, обладающие рыночной ценностью, именуется в настоящем документе «растениями-опылителями двойного назначения». Растения-опылители, которые дают несъедобные и нетоварные плоды, которые легко отличить от бессемянных плодов, именуется в настоящем документе «специализированными растениями-опылителями».

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения генетически немодифицированные растения *Citrullus* по настоящему изобретению являются растениями-опылителями, или растения *Citrullus* по настоящему изобретению используют в качестве растений-опылителей при выращивании на поле. Предпочтительно, растение-опылитель по настоящему изобретению является диплоидным (2n). Растение-опылитель по настоящему изобретению может являться специализированным растением-опылителем, или растение-опылитель может быть использовано для различных целей (двойного назначения).

Термин «растение-опылитель» в настоящем документе означает растение, которое дает пыльцу для оплодотворения другого растения, которое само по себе не производит достаточное количество жизнеспособной пыльцы.

Генетически немодифицированные растения *Citrullus*, содержащие клетки генетически немодифицированных растений *Citrullus* по изобретению, являются еще одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с одним аспектом изобретения растения, обладающие устойчивостью к CGMMV, представляют собой гибридные растения, например, простые гибриды (гибриды F1), полученные скрещиванием двух инбредных родительских линий между собой. Гибридное растение, например, гибрид F1 может быть гомозиготным или гетерозиготным по одному или нескольким QTL, которые придают устойчивость к CGMMV. В соответствии с еще одним аспектом изобретения растения, содержащие один или несколько QTL, которые придают устойчивость к CGMMV, представляют собой инбредные линии.

Также вариантом осуществления изобретения являются семена, из которых могут быть выращены любые описанные растения.

Кроме того, настоящее изобретение относится к частям растений, которые происходят из, получены или могут быть получены из генетически немодифицированных растений *Citrullus* по изобретению. Предпочтительно, части растений по настоящему изобретению содержат клетки генетически немодифицированных растений *Citrullus* по изобретению.

При использовании по тексту настоящего документа термин «часть растения» означает любую часть растения, включая плоды, плодовые части, подвои, прививочные черенки, отростки, пыльцу, пыльники, семязачатки, зародыши, корни, стебли, листья, семядоли, гипокотили, цветы, каллюс, культуры клеток или тканей *in vitro*, в том числе растительный материал, материал для размножения растений *in vitro* и т.д. Часть растения может быть пригодна для регенерации в целое растение (часть растения, способная к регенерации), или она может быть не пригодна для регенерации в целое растение (часть растения, неспособная к регенерации). Такая часть растения, неспособная к регенерации, может быть частью целого растения или частью семени, из которого произрастает такое растение. В такой части растения присутствуют один или несколько QTL, придающие устойчивость к CGMMV, и/или фрагмент(-ы) интрогрессии, содержащие придающие устойчивость QTL, и они могут быть обнаружены, например, с помощью маркерного анализа (например, с использованием одного или нескольких маркеров SNP, описанных в настоящем документе), анализа последовательностей, «рописи» хромосомы и т.д.

Предпочтительными частями растений по настоящему изобретению являются семена или плоды. Предпочтительно, семена или плоды по настоящему изобретению содержат клетки генетически немодифицированных растений *Citrullus* по изобретению.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к бессемянным плодам по настоящему изобретению. Аналогичным образом, еще один вариант осуществления изобретения относится к растениям *Citrullus* по настоящему изобретению, которые дают бессемянные плоды.

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

Термин «бессемянный плод», обычно используемый в данной области, в частности, в селекции, хотя это и не совпадает с ботаническим значением термина «плод», в контексте настоящего изобретения означает плоды без зрелых или жизнеспособных семян. Зрелые или жизнеспособные семена могут прорасти в почве в условиях, пригодных для соответствующего растения, и развиваться в растение. Этот тест может быть использован для определения того, дает ли растение бессемянные плоды. Бессемянные плоды не будут содержать семена, которые прорастут и вырастут в растение в условиях, пригодных для соответствующего растения.

Еще один частный вариант осуществления изобретения относится к материалу для размножения растений, описанных в настоящем документе, или к материалу для размножения растений, содержащему клетки генетически немодифицированных растений по настоящему изобретению, или к материалу для размножения растений, который получают/могут быть получены способом получения растений *Citrullus*, обладающих устойчивостью к CGMMV, по настоящему изобретению. Один из вариантов осуществления изобретения относится к материалу для размножения растений, содержащему один или несколько QTL в соответствии с описанием в настоящем документе. Также в объем изобретения входит материал размножения растений, обладающих устойчивостью к CGMMV, который получен/может быть получен из растений, которые получают в результате скрещивания растения, полученного из семян с номером доступа NCIMB 42624, с другим растением. Предпочтительно, материал для размножения, который получен или можно получить путем скрещивания с растениями, полученными из семян с номером доступа NCIMB 42624, содержит клетки генетически немодифицированного растения по изобретению. В соответствии с одним аспектом изобретение относится к материалу для размножения растений, обладающих устойчивостью к CGMMV и содержащих один или несколько QTL, которые придают устойчивость к CGMMV и которые присутствуют в/получены/могут быть получены из семян с номером доступа NCIMB 42624, или из их потомства, обладающего устойчивостью к CGMMV.

В настоящем документе термин «материал для размножения» включает те компоненты растения, которые пригодны для получения потомства вегетативным (бесполом) или генеративным (половым) путем. Для вегетативного размножения могут быть использованы, например, черенки, культуры ткани *in vitro*, клетки, протопласты, зародыши или каллусные культуры или материал для микроклонального размножения. Прочий материал для размножения включает, например, плоды, семена, сеянцы, обладающие устойчивостью к CGMMV, и т.д. В соответствии с одним аспектом материал для размножения представляет собой черенки, размножение которых осуществляют путем их прививки к другому подвою 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*. Очевидно, что материал для размножения содержит один или несколько QTL, придающих устойчивость к CGMMV в соответствии с описанием.

В овощеводстве для производства сеянцев, которые выращивают после пересадки, все чаще используют прививку. Следует отметить, что этот метод позволяет улучшить качество конечных растений путем сочетания таких свойств подвоя, как устойчивость к абиотическому стрессу, устойчивость к болезням и мощность растения, со свойствами прививочного черенка, который дает плоды высокого качества.

Прививка арбузов имеет ряд преимуществ, как объясняется в работе Davis et al. (2008, Critical Reviews in Plant Sciences том 27, "Cucurbit Grafting", стр. 50-74). Помимо обеспечения устойчивости у грибка и вирусам, прививание может также повысить устойчивость к различным факторам абиотического стресса, таким как низкая температура, засуха, засоленность почвы, избыток влаги, и может оказывать благоприятный эффект, например, на рост, урожайность, усвоение питательных веществ, мощность растений, размер и качество плодов.

Основным преимуществом прививки по настоящему изобретению является то, что при прививке можно использовать подвои или прививочные черенки, которые обеспечивают или повышают устойчивость к болезням, возникшим в почве, особенно когда невозможно применить генетические или химические подходы к лечению болезней, или когда такие подходы недостаточно эффективны, как в настоящем случае, при инфицировании растений арбуза вирусом CGMMV.

Таким образом, устойчивые к CGMMV подвои или прививочные черенки могут быть использованы для прививания, например, прививочных черенков или подвоев, восприимчивых к CGMMV перед трансплантацией. Прививочные черенки арбуза, восприимчивого к CGMMV, прививаться к подвоям, обладающим устойчивостью к CGMMV, для получения растений арбуза, прививочные черенки, обладающие устойчивостью к CGMMV, могут прививаться к подвоям, восприимчивым к CGMMV. Было обнаружено, что прививочный черенок, обладающий устойчивостью к CGMMV, после прививки на подвой, зараженный вирусом CGMMV, не проявляет симптомов CGMMV (степень выраженности симптомов CGMMV у такого прививочного черенка составляет 4 балла), т.е. продолжает иметь устойчивость CGMMV в фенотипе.

В работе Park et al. (2005, Plant Cell Rep 24, 350) описано получение трансгенных растений арбуза, обладающих устойчивостью к CGMMV, из дикого сорта *Citrullus lanatus* подвид *gongdae* путем введения рекомбинантной нуклеиновой кислоты, придающей экспрессию белка оболочки CGMMV трансгенному растению. Авторами указанной работы предлагается использовать такие трансгенные растения для получения подвоев, на которые можно прививать прививочные черенки культурных растений *Citrullus* для предотвращения потерь урожая, связанных с заражением CGMMV.

Неожиданно было обнаружено, что в соответствии с настоящим изобретением прививка прививочного черенка растения *Citrullus*, обладающего устойчивостью к CGMMV, на подвой восприимчивого растения *Citrullus*, инфицированного CGMMV, обеспечивает возможность выращивания растений *Citrullus* без симптомов CGMMV. Преимущество настоящей заявки состоит в том, что из привитых сеянцев *Citrullus*, включающих подвой и/или прививочный черенок, которые обладают устойчивостью к CGMMV, могут быть выращены растения без симптомов. Таким образом, можно выращивать такие растения даже на территориях, где почва заражена CGMMV без потери качества плодов и без снижения урожайности. Таким образом, с использованием прививочного черенка, обладающего устойчивостью к CGMMV, по изобретению, в частности, прививочного черенка культурного арбуза, содержащего один или несколько QTL в соответствии с описанием в настоящем документе, в сочетании с подвоем,

который может быть восприимчивым к CGMMV, можно получить прививочный черенок без симптомов CGMMV.

Таким образом, другими предпочтительными частями растений по настоящему изобретению являются подвой и/или прививочные черенки. Предпочтительно, подвой и/или прививочные черенки по настоящему изобретению содержат клетки генетически немодифицированных растений *Citrullus* по изобретению. Подвой и/или прививочный черенок содержит один или несколько (или все) QTL, описанные в настоящем документе, которые можно обнаружить с использованием, например, маркеров SNP, связанных с такими QTL.

В соответствии с одним аспектом изобретения подвой и/или прививочный черенок представляют собой подвой и/или прививочный черенок *Citrullus*, обладающие устойчивостью к CGMMV, в частности, подвой и/или прививочный черенок *C. colocynthis* по изобретению, содержащие один или несколько QTL в соответствии с описанием в настоящем документе, например, NCIMB 42624, или его потомства. В документе Bigdelo et al. 2017 (Australian Journal of Crop Science, AJCS, 11(06):727-732) описаны преимущества использования подвоя *C. colocynthis* с прививочными черенками культурного арбуза.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения подвой и/или прививочный черенок представляют собой подвой культурного арбуза, обладающий устойчивостью к CGMMV, по настоящему изобретению, содержащий один или несколько QTL в соответствии с описанием в настоящем документе, например, QTL, которые можно получить их семенами, внесенными в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из его потомства, например, путем (обратного) скрещивания таких растений или их потомства с культурным арбузом и путем отбора потомства, содержащего один или несколько QTL из растения *C. colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV.

В настоящем документе термин «подвой», касающийся области прививки растений, относится к отделенной части растения или к стеблю, на котором осуществляют прививание. Обычно подвой представляет собой нижнюю часть растения (включая корни) и нижнюю часть стебля привитого растения. Во время прививки или непосредственно после прививки нет необходимости, чтобы подвой

включал корни, поскольку в соответствующих случаях, если они были удалены ранее, корни будут отрастать от черенка подвоя.

Термин «прививочный черенок» относится к отдельной живой части растения (такой как побег или ветвь), которая представляет собой исключительно надземные части для привитого растения.

Кроме того, способы прививки растений арбуза описаны в See also US 2013/0298273 A1, который включен в настоящую заявку посредством ссылки, как для одиночных, так и для двойных прививок.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения подвой по настоящему изобретению и/или прививочный черенок по настоящему изобретению представляют собой подвой и/или прививочный черенок, соответственно, культурного растения арбуза, содержащего один или несколько QTL, которые происходят, получены или могут быть получены из растения *Citrullus colocynthis*, обладающего устойчивостью к CGMMV, например, растения, выращенного из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из их потомства, в качестве донора фрагментов интрогрессии, содержащих один или несколько QTL, например, QTL7.1 и/или QTL9.1.

В соответствии с другим аспектом подвой по настоящему изобретению и/или прививочный черенок по настоящему изобретению представляют собой подвой и/или прививочный черенок, соответственно, которые происходят, получены или могут быть получены из растения, выращенного из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из их потомства.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к привитому растению, содержащему, по меньшей мере, один подвой и, по меньшей мере, один прививочный черенок, при этом, по меньшей мере, один подвой привитого растения представляет собой подвой по настоящему изобретению, или, по меньшей мере, один прививочный черенок привитого растения представляет собой прививочный черенок по настоящему изобретению, и/или, по меньшей мере, один подвой привитого растения содержит клетки генетически немодифицированного растения *Citrullus* по настоящему изобретению, или, по меньшей мере, один прививочный черенок привитого растения содержит клетки

генетически немодифицированного растения *Citrullus* по настоящему изобретению.

Предпочтительный вариант осуществления изобретения относится к привитому растению по настоящему изобретению, в котором, по меньшей мере, один прививочный черенок привитого растения представляет собой прививочный черенок по настоящему изобретению, и/или, по меньшей мере, один прививочный черенок привитого растения содержит клетки генетически немодифицированного растения *Citrullus* по настоящему изобретению. Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения прививочный черенок представляет собой прививочный черенок растения, обладающего устойчивостью к CGMMV, по изобретению, в частности, прививочный черенок культурного арбуза, содержащего один или несколько QTL. Подвой может быть восприимчивым к CGMMV, тем не менее, например, подвой также может обладать устойчивостью к CGMMV. Аналогичным образом, подвой может быть любым известным подвоем, таким как подвои от растений родов *Lagenaria* или *Cucurbita*, или другие подвои, описанные в настоящем документе и известные специалистам.

В качестве альтернативы, два прививочных черенка могут прививаться на один подвой, таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения, по меньшей мере, один из двух прививочных черенков, при необходимости, оба прививочных черенка являются прививочными черенками растения, обладающего устойчивостью к CGMMV, по изобретению, в частности, прививочными черенками культурного арбуза.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения привитое растение по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, один подвой по настоящему изобретению, и/или, по меньшей мере, один подвой привитого растения содержит клетки генетически немодифицированного растения *Citrullus* по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения привитое растение по настоящему изобретению представляет собой сеянец или привитый сеянец.

В контексте настоящего изобретения термин «привитое растение» относится к растению, которое внешне выглядит как единое растение или растет

как единое растение, но которое, тем не менее, состоит из разных частей растения, при этом эти части растения происходят от растений с разными генотипами. Обычно такие части разных растений именуются «подвой» и «прививочный черенок».

Термин «прививка» относится к способу объединения частей разных растений с разными генотипами, таким образом, чтобы эти части разных растений внешне выглядели как единое растение или росли как единое растение.

Термин «сеянец» в настоящем документе относится к молодому растению, в частности, к молодому растению, которое развивается из зародыша семени.

Термин «привитый сеянец» в настоящем документе относится к молодому растению, которое состоит из частей разных сеянцев с разным генотипом. Обычно такие разные части именуются «подвой» и «прививочный черенок».

Специалистам известно, что привитое растение или сеянец могут состоять из более чем двух частей разных растений. Привитые растения могут быть, например, состоять из более чем одного подвоя. Способ, используемый для получения растений такого типа, является общеизвестным в данной области и называется «прививка на нескольких подвоях» в отличие от прививки на один подвой. Привитые растения арбуза или способы получения привитых растений арбуза с одним подвоем («прививка на один подвой»), с двумя подвоями («прививка на двойной подвой») или с тремя подвоями («прививка на тройной подвой»), известны специалистам и описаны, например, в работе (Qin et al., 2014, Not Bot Agrobi 42(2), 495-500).

Таким образом, еще один вариант осуществления изобретения относится к привитому растению по настоящему изобретению или к привитому сеянцу по настоящему изобретению, которые содержат один, два или три подвоя. Более предпочтительно, привитое растение по настоящему изобретению или привитый сеянец по настоящему изобретению содержат два подвоя, еще более предпочтительно – один подвой.

Обычно прививочные черенки *Citrullus* прививаются на подвои *Citrullus*. В большинстве случаев при прививке арбуза используются подвои от других тыквенных культур, в частности, например, от растений родов *Lagenaria*, *Cucurbita* и межвидовых гибридов *Cucurbita*. Растения арбуза прививают на подвои от других

тыквенных культур, например, для борьбы с фузариозным вилтом, повышения устойчивости к низким температурам и повышения урожайности за счет увеличения водопоглощения и усвоения питательных веществ растениями. Для прививания арбуза обычно используются подвои от следующих растений: *Cucurbita moschata* (тыква мускатная), *Cucurbita maxima* (тыква крупноплодная), *Benincasa hispida* (восковая тыква), *Lagenaria siceraria* (лагенария обыкновенная), а также от гибридов вышеуказанных видов, например, *Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata* (Yetisir & Sari, 2003, *Australian J. Experimental Agriculture* 43, 1269-1274).

При прививании арбуза подвои *Lagenaria siceraria*, *Benincasa hispida*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita pepo* и гибридов *Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata* используются, например, для борьбы с фузариозным вилтом, а подвои *Sicyos angulatus* – для борьбы с нематодами. Кроме того, при прививании арбуза подвои гибридов *Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata*, *Cucurbita moschata* или *Cucurbita pepo* для повышения устойчивости к низким температурам (Singh & Rao, 2014, *Agri. Reviews* 35(1), 24-33).

При прививке прививочного черенка по настоящему изобретению к соответствующему подвою теперь можно бороться с заражением CGMMV культурных растений *Citrullus*, помимо контроля других биотических или абиотических стрессов. Это может быть обеспечено путем прививки прививочного черенка по настоящему изобретению к соответствующему подвою, который может быть выбран согласно потребностям для соответствующей посевной площади, например, для борьбы со специфическим фактором биотического (например, заражение фузариозом или нематодой) и/или фактором абиотического (например, с низкой температурой) стресса.

Таким образом, еще один вариант осуществления изобретения относится к привитому растению по настоящему изобретению или привитому сеянцу по настоящему изобретению, в котором, по меньшей мере, один подвой получен из растения *Citrullus* или растения другого рода, предпочтительно подвой, полученный из растения другого рода, выбран из группы, состоящей из растений родов *Cucurbita*, *Lagenaria*, *Sicyos* или *Benincasa* или гибридов растений из этих родов. В соответствии с более предпочтительным вариантом осуществления изобретения привитое растение по настоящему изобретению или привитый сеянец по настоящему изобретению содержат, по меньшей мере, один подвой,

полученный из растений, выбранных из группы, состоящей из растений *Citrullus lanatus*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo*, *Benincasa hispida*, *Lagenaria siceraria*, *Sicyos angulatus* или гибридов *Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata*.

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения привитое растение по настоящему изобретению или привитый сеянец по настоящему изобретению содержат прививочный черенок по настоящему изобретению и содержат подвой, полученный из растений, выбранных из группы, состоящей из растений *Lagenaria*, *Citrullus lanatus*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima* или гибридов *Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata*, более предпочтительно — подвой получен из растений, выбранных из группы, состоящей из растений, выбранных из *Citrullus lanatus* или гибридов *Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata*.

Предпочтительным гибридом *Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata* в контексте настоящего изобретения является гибрид *Cucurbita maxima* × *Cucurbita moschata*, сорт *Ercole* (компании «Nunhems», коммерчески доступен). Другими предпочтительными подвоями являются подвой гибрида *Shintosa*, например, подвой *Shintosa* сорта *Camelforce* (компании «Nunhems», коммерчески доступен) или подвой рода *Lagenaria*, например, гибрида *Lagenaria* сорта *Colosso* (компании «Nunhems», коммерчески доступен).

Как и в случае с подвоями, специалистам известно, что привитое растение может иметь более одного прививочного черенка. Растения с двумя прививочными черенками или «дважды привитые растения» арбуза, имеющие два черенка, привитых к подвою, описаны, например, в WO2012062672 A1 и US 20130298273. В документе US 20130298273 описаны растения арбуза с двумя прививочными черенками, привитыми к подвою, при этом прививочные черенки могут быть из генетически идентичных растений или из генетически различных растений. Прививочные черенки могут быть диплоидными (2n) или триплоидными (3n). Что касается прививочных черенков, полученных от генетически различных растений, один черенок, привитый к подвою, может быть диплоидным (2n), а второй черенок, привитый к тому же подвою, может быть триплоидным (3n). Такая комбинация диплоидного (2n) и триплоидного (3n) прививочных черенков, которые привиты к одному и тому же подвою, может быть использована для получения бессемянных плодов (см. выше), при этом диплоидный прививочный черенок в таком случае

может представлять собой специализированное растение-опылитель или растение-опылитель двойного назначения.

Таким образом, еще один вариант осуществления изобретения относится к привитому растению по настоящему изобретению или к привитому сеянцу по настоящему изобретению, которые содержат, по меньшей мере, два прививочных черенка, при этом, по меньшей мере, один прививочный черенок представляет собой прививочный черенок по настоящему изобретению и/или, по меньшей мере, один прививочный черенок содержит клетки генетически немодифицированного растения *Citrullus* по настоящему изобретению. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения привитое растение по настоящему изобретению или привитый сеянец содержат два прививочных черенка по настоящему изобретению и/или каждый из двух прививочных черенков содержат клетки генетически немодифицированного растения *Citrullus* по настоящему изобретению. В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения два подвоя по настоящему изобретению имеют идентичный (одинаковый) генотип и/или два прививочных черенка содержат клетки генетически немодифицированных растений *Citrullus* по изобретению с идентичным (одинаковым) генотипом. В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения два подвоя по настоящему изобретению имеют различный генотип и/или два прививочных черенка содержат клетки генетически немодифицированных растений *Citrullus* по изобретению с отличающимся друг от друга генотипом, предпочтительно один прививочный черенок является диплоидным ($2n$), а второй – триплоидным ($3n$). Что касается привитых растений по настоящему изобретению или привитых сеянцев по настоящему изобретению, в случае если прививочный черенок является диплоидным ($2n$), а второй прививочный черенок является триплоидным ($3n$), диплоидный ($2n$) прививочный черенок может являться специализированным растением-опылителем или растением-опылителем двойного назначения.

В соответствии с частным вариантом осуществления изобретения привитое растение по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, один подвой по настоящему изобретению и, по меньшей мере, один прививочный черенок по настоящему изобретению. Предпочтительно привитое растение по настоящему изобретению содержит один подвой по настоящему изобретению и, по меньшей

мере, один прививочный черенок по настоящему изобретению или привитое растение по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, один подвой по настоящему изобретению и один прививочный черенок по настоящему изобретению. Более предпочтительно, привитое растение по настоящему изобретению содержит один подвой по настоящему изобретению и один прививочный черенок по настоящему изобретению.

Способы получения привитых растений, включая растения арбуза, общеизвестны для специалистов в этой области. Известны способы ручной прививки и машинной (автоматизированной) прививки. Для прививки арбуза известны различные способы прививки, в том числе копулировка с язычком, прививка со вставкой, прививка одной семядоли и прививка в боковой зарез. (Hassell et al., 2008, HortScience 43(6), 1677).

Способы прививки овощей, включая арбуз, также рассматриваются в работе Singh & Rao (2014, Agri. Reviews 35(1), 24-33).

Как обсуждалось выше, получение растений *Citrullus*, обладающих устойчивостью к CGMMV, позволяет получать другие сельскохозяйственные культуры *Citrullus*, обладающие устойчивостью к CGMMV.

Таким образом, еще один вариант осуществления изобретения относится к способу получения растения *Citrullus*, обладающего устойчивостью к CGMMV, при этом такой способ включает следующие этапы:

- a) скрещивание растения *Citrullus*, обладающего устойчивостью к CGMMV, (донора) с другим растением *Citrullus* (реципиентом), например, с растением, восприимчивым к CGMMV, или получение потомства такого скрещивания и
- b) получение семян растений, полученных путем скрещивания в соответствии с этапом a), или отбор семян/растений, содержащих устойчивость к CGMMV.

Указанный способ может, при необходимости, также включать самоопыление и/или обратное скрещивание (например, с другим растением *Citrullus* в соответствии с этапом a), например, с восприимчивой линией или сортом культурного арбуза) растения, выращенного из семян в соответствии с этапом b) один или несколько раз и отбор потомства, полученного в результате такого

самоопыления и/или обратного скрещивания, содержащего устойчивость к CGMMV (например, содержащего один или несколько QTL).

Отбор растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, может осуществляться фенотипически и/или генотипически с использованием, например, маркеров SNP, связанных с QTL, описанными в настоящем документе. Так, например, растение-донор может содержать один или несколько или все QTL из QTL1.1, QTL4.1, QTL5.2, QTL7.1 и QTL9.1. Донором может быть, например, растение-донор *C. colocynthis* (полученное, при необходимости, путем одного или нескольких самоопылений) или растение-донор *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*, в которое интродуцированы один или несколько QTL, которые в соответствии с этим способом переносятся в другое растение, восприимчивое к CGMMV.

Отбор растения-донора и/или обладающего устойчивостью к CGMMV потомства донора может осуществляться в соответствии с описанием в настоящем документе, например, фенотипически, например, с использованием механической инокуляции листьев для определения фенотипа устойчивости, и/или путем определения уровней вируса CGMMV с использованием ОТ-кПЦР, и/или с помощью других анализов для обнаружения вируса CGMMV, таких как метод ИФА или дот-блоттинг, и/или быстрых анализов для выявления симптомов CGMMV, таких как погружение корней в вирусные растворы или замачивание семян в вирусном растворе и т.д., и/или генотипически с использованием одного или нескольких молекулярных маркеров, связанных с QTL, в соответствии с описанием в настоящем документе. Таким образом, может осуществляться тестирование донора на устойчивость к CGMMV и/или, например, на наличие генотипа устойчивости к CGMMV в отношении одного или нескольких SNP из SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP5 и/или SNP6, связанных с QTL1.1; и/или одного или нескольких их SNP7, SNP8 и/или SNP9, связанных с QTL4.1; и/или одного или нескольких их SNP10, SNP11 и/или SNP12, связанных с QTL5.2; и/или одного или нескольких их SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и/или SNP18, связанных с QTL7.1; и/или одного или нескольких их SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и/или SNP24, связанных с QTL9.1, которые описаны по тексту настоящего документа.

Растение, обладающее устойчивостью к CGMMV, согласно этапу а) способа получения растения *Citrullus* по настоящему изобретению может представлять

собой любое растение *Citrullus*, при условии, что оно обладает устойчивостью к CGMMV. Предпочтительно, растение *Citrullus*, полученное на этапе а), представляет собой растение *Citrullus* с диплоидным ($2n$) числом хромосом, которое составляет 22, и/или такое растение может скрещиваться с культурным растением *Citrullus*. Более предпочтительно, растение, обладающие устойчивостью к CGMMV, согласно этапу а) представляет собой генетически немодифицированное растение по настоящему изобретению, более предпочтительно растение вида *Citrullus colocynthis*, еще более предпочтительно растение, выращенное из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624. В соответствии с еще одним аспектом такое растение представляет собой растение культурного арбуза в соответствии с описанием, например, растение, содержащее один или несколько или все QTL, придающие устойчивость к CGMMV, которые интрогрессированы из растения-донора *C. colocynthis*, например, один или несколько QTL, которые получены/могут быть получены из семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, или из их потомства, обладающего устойчивостью к CGMMV.

Таким образом, описанный выше способ может, при необходимости, включать этап анализа ДНК на наличие одного или нескольких маркеров, связанных с любым одним или с несколькими QTL, для отбора, при необходимости, донора и/или потомства, которые содержат один или несколько QTL. В соответствии с одним аспектом изобретения QTL7.1 и/или QTL9.1 присутствуют у донора и переносятся в потомство, полученное путем скрещивания. Если донор представляет собой элитную линию или сорт культурного арбуза, которые уже содержат фрагмент интрогрессии (содержащий QTL), то достаточно просто отобрать потомство, которое сохраняет рекомбинантную хромосому, содержащую такой фрагмент интрогрессии. Это может с легкостью осуществляться путем тестирования фенотипа и/или генотипирования с использованием одного или нескольких маркеров SNP, например, путем KASP-анализа или другого анализа генотипирования. Очевидно также, что для определения наличия последовательностей, содержащих донорские нуклеотиды могут быть использованы и другие методы, такие как секвенирование.

Скрещивание представляет собой процесс, известный специалистам. Другое растение *Citrullus* согласно этапу а) способа получения растения *Citrullus*

предпочтительно представляет собой растение *Citrullus lanatus*, *Citrullus colocynthis* или *Citrullus naudinianus*, более предпочтительно, это растение представляет собой растение *Citrullus lanatus*, наиболее предпочтительно, это растение представляет собой растение *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*. В соответствии с одним аспектом изобретения это линия или сорт культурного арбуза, восприимчивые к CGMMV.

Анализы для детекции белков CGMMV в растениях являются коммерчески доступными, например, в виде набора реагентов для детекции CGMMV методом ИФА или в виде теста ImmunoStrip для детекции CGMMV, доступны для приобретения у компании Agdia, Inc., 52642 Каунти-Роуд 1, Элхарт, штат Индиана, США 46514. Такие тесты могут быть использованы для обнаружения белков CGMMV в инфицированных растениях и, таким образом, могут также использоваться для выявления отсутствия вирусного белка в ранее инокулированных растениях.

Детекция РНК CGMMV в растительном материале может осуществляться различными способами, например, путем анализа на основе ПЦР в соответствии с описанием в настоящем документе в разделе «Общие методы». Высокочувствительный тест для детекции CGMMV на основе ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени описан Hongyun et al. (2008, J Virological Methods 149, 326-329).

В качестве фенотипического теста для выявления устойчивых к CGMMV растений предпочтительно используют тестирование на основе визуальной оценки симптомов в соответствии с описанием в настоящем документе в разделе «Общие методы», очевидно, что могут применяться и другие тесты, например, полевые тесты с использованием соответствующих восприимчивых контрольных растений.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения предлагаемый способ для получения растения *Citrullus* по изобретению включает дополнительный этап, в ходе которого получают другие растения *Citrullus* с использованием идентифицированного растения *Citrullus*, обладающего устойчивостью к CGMMV. Способы получения других растений из ранее полученного растения известны специалистам. Полученные другие растения характеризуются тем, что они обладают устойчивостью к CGMMV. Эти дополнительные растения могут быть получены посредством вегетативного

(бесполого) или генеративного (полового) размножения или путем скрещивания с другими растениями *Citrullus*. Для вегетативного размножения могут быть использованы, 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, гетерозиготные или гетерозиготные по хромосомным фрагментам, придающим устойчивость к CGMMV.

Способы вегетативного (бесполого) размножения, в том числе микроклональное размножение растений известны специалистам и описаны, например, для банана, цитрусовых, манго, папайи, авокадо, (сладкой) дыни в работе Pua and Davey (2007, Springer Science & Business Media, ISBN: 3540491619, 9783540491613). Для арбуза различные способы культивирования тканей и микроклонального размножения описаны, например, в работе Sultana and Rhaman (2012, LAP Lambert Academic Publishing, ISBN-13: 978-3-8484-3937-9).

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения предлагаемый способ для получения растения *Citrullus* является способом получения генетически немодифицированных растений *Citrullus* по настоящему изобретению.

Растения, которые получают/могут быть получены способом получения растений *Citrullus* по настоящему изобретению, также являются вариантом осуществления изобретения.

Как указано выше, растения, обладающие устойчивостью к CGMMV, описанные в настоящем документе, также могут быть использованы для получения привитых растений, обладающих устойчивостью к CGMMV.

Таким образом, еще один вариант осуществления изобретения относится к первому способу получения привитого растения или привитого сеянца, включающий следующие этапы:

- a) получение подвоя, выбранного из растений родов из следующей группы: *Citrullus*, *Curcubita*, *Lagenaria*, *Sicyos* или *Benincasa*, или из гибридов, полученных путем скрещивания двух видов из любых указанных родов,
- b) получение прививочного черенка по настоящему изобретению,

- с) прививка указанного прививочного черенка, полученного в соответствии с этапом b), на подвой, полученный в соответствии с этапом а).

Выше было указано, что для прививки растений *Citrullus* в данной области часто используются подвои растений из разных родов. Следовательно, в отношении этапа а) первого способа получения привитого растения или привитого сеянца по настоящему изобретению, подвой может быть получен из растений родов, указанных для этапа а). Гибрид, указанный для этапа (а) первого способа по изобретению для получения привитого растения или привитого сеянца, может представлять собой любой гибрид, полученный путем скрещивания двух различных видов, выбранных из указанных родов. Следовательно, гибрид может быть получен путем скрещивания двух различных видов одного и того же рода или путем скрещивания двух различных видов из разных родов.

Предпочтительно, подвой согласно этапу а) выбран из группы видов, состоящей из *Citrullus lanatus*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo*, *Benincasa hispida*, *Lagenaria siceraria*, *Sicyos angulatus* или из гибридных растений, полученных путем скрещивания двух видов рода *Cucurbita*.

Примерами специфических подвоев являются подвои сортов *Macis F1* компании *Nunhems* (вид *Lagenaria siceraria*), *Nun 3001 RT F1* (вид *Lagenaria siceraria*), *Shintosa Camelforce F1* (межвидовой гибрид *Cucurbita*), *Ercole F1* (межвидовой гибрид *Cucurbita*); или подвои сорта *Emphasis* компании *Syngenta* (подвой рода *Langenaria*) и *Strong Tosa* (межвидовой гибрид тыквы) или другие подвои, совместимые с арбузом.

В соответствии с одним частным вариантом осуществления изобретения, который относится к этапу а) способа получения привитого растения или привитого сеянца по настоящему изобретению, подвой представляет собой подвой по настоящему изобретению и/или подвой содержит клетки генетически немодифицированного растения *Citrullus* по настоящему изобретению.

Прививочный черенок согласно этапу b) первого предлагаемого способа получения привитого растения или привитого сеянца может представлять собой любой прививочный черенок, описанный в настоящем документе в качестве одного из вариантов осуществления прививочного черенка по настоящему изобретению.

Предпочтительно, прививочный черенок согласно этапу b) получен из генетически немодифицированного растения *Citrullus* по изобретению, более предпочтительно прививочный черенок получен из генетически немодифицированного растения *Citrullus lanatus* по изобретению, наиболее предпочтительно — из генетически немодифицированного растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* по изобретению.

Еще один вариант осуществления изобретения относится ко второму способу получения привитого растения или привитого сеянца, включающий следующие этапы:

- a) получение подвоя по настоящему изобретению,
- b) получение прививочного черенка растения рода *Citrullus*,
- c) прививка указанного сеянца, полученного в соответствии с этапом b), на подвой, полученный в соответствии с этапом a).

Подвой согласно этапу a) второго предлагаемого способа получения привитого растения или привитого сеянца может представлять собой любой подвой, описанный в настоящем документе в качестве одного из вариантов осуществления подвоя по настоящему изобретению. Предпочтительно подвой согласно этапу a) получен из генетически немодифицированного растения *Citrullus* по изобретению, более предпочтительно подвой получен из генетически немодифицированного растения *Citrullus colocynthis* или *Citrullus lanatus* (включая *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*) по изобретению. В соответствии с одним аспектом изобретения в качестве подвоя на этапе (a) используют растение NUN 42624, или его потомок, обладающий устойчивостью к CGMMV.

Прививочный черенок согласно этапу b) второго предлагаемого способа получения привитого растения или привитого сеянца может представлять собой прививочный черенок любого вида, выбранного из следующей группы: *Citrullus lanatus*, *Citrullus colocynthis* или *Citrullus naudinianus*. Предпочтительно, прививочный черенок представляет собой прививочный черенок из растения *Citrullus lanatus*, более предпочтительно прививочный черенок представляет собой прививочный черенок из растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*. В соответствии с одним аспектом изобретения прививочный черенок представляет собой прививочный черенок растения культурного арбуза, обладающего устойчивостью к CGMMV, по изобретению, содержащего один или несколько описанных QTL.

В соответствии с одним частным вариантом осуществления изобретения, который относится к этапу b) второго способа получения привитого растения или привитого сеянца по настоящему изобретению прививочный черенок представляет собой прививочный черенок по настоящему изобретению и/или прививочный черенок содержит клетки генетически немодифицированного растения *Citrullus* по настоящему изобретению.

В настоящем документе описаны известные способы прививки, которые могут соответствующим образом применяться в отношении этапа c) первого и второго предлагаемого способа получения привитого растения или привитого сеянца. При необходимости, в зависимости от используемого способа прививки, после того, как подвой и прививочный черенок соединены, для предотвращения высыхания привитого растения, и чтобы способствовать заживлению, область соединения подвоя и прививочного черенка может быть закрыта замазкой (например, с добавлением алюминия) и/или прививочным зажимом, при этом для соединения подвоя и прививочного черенка может быть использована силиконовая муфта.

В некоторых случаях, первый или второй способ получения привитых растений или привитых сеянцев по изобретению включают еще один этап d), в ходе которого привитые растения, полученные на этапе c), помещают в помещение, где заживление растений будет происходить быстрее, или в камеру влажности. Предпочтительно привитые растения хранят в помещении, где заживление растений происходит быстрее, или в камере влажности до тех пор, пока процесс заживления не будет завершен. После того, как процесс заживления завершен, перед высадкой растений их помещают в теплицу для акклиматизации.

В соответствии с одним частным вариантом осуществления изобретения, подвой согласно этапу a) и прививочный черенок согласно этапу b) первого или второго предлагаемого способа получения привитого растения или привитого сеянца может представлять собой любой подвой или прививочный черенок, описанный в настоящем документе в качестве одного из вариантов осуществления подвоя или прививочного черенка, соответственно, по настоящему изобретению. Предпочтительно, прививочный черенок согласно этапу b) получен из генетически немодифицированного растения *Citrullus* по изобретению, более предпочтительно подвой согласно этапу a) представляет собой подвой из генетически

немодифицированного растения *Citrullus colocynthis* или *Citrullus lanatus* по изобретению, наиболее предпочтительно из генетически немодифицированного растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* по изобретению. Предпочтительно, прививочный черенок согласно этапу b) получен из генетически немодифицированного растения *Citrullus* по изобретению, более предпочтительно прививочный черенок получен из генетически немодифицированного растения *Citrullus lanatus* по изобретению, наиболее предпочтительно из генетически немодифицированного растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* по изобретению.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения первый или второй способ получения привитого растения или привитого сеянца используют для получения привитого растения или привитого сеянца по настоящему изобретению. Таким образом, следует понимать, что с помощью первого или второго предлагаемого способа получения привитого растения или привитого сеянца могут быть получены также привитые растения или привитые сеянцы, имеющие, по меньшей мере, два разных подвоя и/или, по меньшей мере, два разных прививочных черенка.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к привитым растениям или сеянцам, обладающим устойчивостью к CGMMV, которые получены или могут быть получены первым или вторым предлагаемым способом получения привитых растений или привитых сеянцев.

При получении растений по настоящему изобретению обеспечивается возможность борьбы с заражением CGMMV растений *Citrullus*, возможность снижения, предотвращения потерь урожая или борьбы с потерями урожая в результате заражения CGMMV плодов растений *Citrullus*, или возможность получения семян, обладающих устойчивостью к CGMMV, от растений *Citrullus*.

Таким образом, еще один вариант осуществления изобретения относится к способу борьбы с заражением CGMMV растений *Citrullus*, при этом такой способ включает следующие этапы:

посев семени по настоящему изобретению или высадка привитого растения по настоящему изобретению или высадка привитого сеянца по настоящему изобретению.

выращивание посеянного растения или выращивание привитого растения или привитого сеянца в соответствии с этапом а).

Термин «высадка» в настоящем документе означает перенос (вручную или с использованием каких-либо устройств) сеянцев или привитых сеянцев на площадь, где они будут выращиваться или культивироваться.

На этапе а) предлагаемого способа борьбы с заражением CGMMV растений *Citrullus* семена предпочтительно высевают на посевную площадь, которая может представлять собой любую площадь, которая может быть использована для выращивания растений *Citrullus*, например, поле, горшок или лоток, при этом горшок или поднос можно поместить на открытое пространство или в теплицу, причем площадь выращивания может быть закрытой или не закрытой, например, растения могут выращиваться в туннелях из пленки или полотна.

Предпочтительно у растений *Citrullus*, выращенных согласно этапу b) предлагаемого способа борьбы с заражением CGMMV, наблюдается отсутствие симптомов CGMMV (4 балла) или слабо выраженные симптомы (3 балла) после заражения CGMMV из-за устойчивости к CGMMV, которая содержится в семенах или привитых растениях согласно этапу а).

В соответствии с одним частным вариантом осуществления изобретения предлагаемый способ борьбы с заражением CGMMV является способом снижения, предотвращения потерь урожая или борьбы с потерями урожая в результате заражения CGMMV плодов растений *Citrullus*, при этом указанный способ включает дополнительный этап с) сбора плодов растений, выращенных согласно этапу b).

Еще один вариант осуществления изобретения относится к растениям, обладающим устойчивостью к CGMMV, которые получены или могут быть получены предлагаемым способом снижения, предотвращения потерь урожая или борьбы с потерями урожая в результате заражения CGMMV плодов растений *Citrullus*, в частности, растений культурного арбуза. Такие плоды можно отличить от других плодов благодаря наличию одного или нескольких QTL, которые могут быть обнаружены с помощью маркеров SNP, связанными с QTL. Другими словами, такие плоды содержат, по меньшей мере, одну рекомбинантную хромосому, содержащую фрагмент интрогрессии из растения-донора *C. colocynthis*, при этом

такой фрагмент интрогрессии может быть обнаружен с помощью последовательностей и маркеров SNP, связанными с QTL. Предпочтительно такие плоды имеют высокое агрономическое качество, высокое содержание сухих веществ по ареометру Брикса, хорошую текстуру мякоти и не проявляют симптомов CGMMV внутри. Предпочтительно в таких плодах вирус CGMMV не обнаруживается с помощью, например, ОТ-кПЦР. Плоды содержат одну, две, три или четыре рекомбинантных хромосомы, в зависимости от пloidности. В соответствии с одним аспектом изобретения плоды являются триплоидными и бессемянными и содержат три копии рекомбинантной хромосомы и, таким образом, три копии фрагмента интрогрессии и три копии донорских нуклеотидов SNP, например, для SNP14, связанного с QTL7.1, генотип SNP будет «AAA» (три копии SEQ ID NO: 14) для устойчивых растений и частей растения. В диплоидном растении арбуза гомозиготном по QTL7.1, генотип SNP будет «AA» для SNP14, а в тетраплоидном растении арбуза гомозиготном по QTL7.1, генотип SNP будет «AAAA» для SNP14. То же самое относится и к другим маркерам SNP в Таблице 1 и Таблице 6. Генотипирование SNP может осуществляться различными способами, например, можно использовать KASP-анализ или другие способы, такие как секвенирование и т.д.

Термины «содержание сухих веществ по ареометру Брикса» или «градус Брикс» или «брикс» относятся к среднему общему содержанию растворимых сухих веществ, которое измеряется в нескольких зрелых плодах с помощью рефрактометра. Предпочтительно рассчитывается среднее значение, по меньшей мере, для трех плодов, при этом измерения производятся в точке между центром и кожурой разрезанных плодов.

В соответствии с одним аспектом изобретения содержание сухих веществ по ареометру Брикса в плодах растений культурного арбуза по изобретению, содержащих один или несколько QTL в соответствии с описанием, составляет, по меньшей мере, 9,0, предпочтительно, по меньшей мере, 10,0 или 11,0 или более.

В соответствии с одним аспектом изобретения плоды растений культурного арбуза по изобретению, содержащие один или несколько QTL в соответствии с описанием, обладают рыночной ценностью. «Обладать рыночной ценностью» в отношении качества плода означает, что плоды арбуза пригодны для продажи для употребления в пищу в свежем виде, у них не наблюдается внешних или

внутренних симптомов заражения CGMMV, они имеют хороший запах (посторонние запахи отсутствуют), градус Брикс составляет, по меньшей мере, 9,0, предпочтительно, по меньшей мере, 10,0 или, по меньшей мере, 11,0, и предпочтительно у них также равномерный цвет мякоти плода, например, белый (например, сорт Cream of Saskatchewan), желтый (например, сорт Yamato Cream 1), оранжевый (например, сорт Tendersweet), розовый (например, сорт Sadul), розовато-красный (например, сорт Crimson Sweet), красный (например, сорт Sugar Baby) или темно-красный (например, сорт Dixie Lee).

Выражение «равномерный цвет мякоти плода» означает, что цвет всего зрелого плода при разрезании через середину (срединный разрез) является однородным по всей мякоти плода, то есть отсутствуют какие-либо пятна. Так, красный плод имеет красный цвет по всей мякоти плода и не содержит белых пятен. Примером плода с равномерным красным цветом является диплоидный сорт Premium F1 (компания Nunhems).

Преимущество настоящего изобретения состоит в том, что плоды генетически немодифицированных растений *Citrullus* или привитых растений по изобретению, или у плодов, которые дают растения в соответствии с одним из способов по изобретению, описанные в настоящем документе, не наблюдаются симптомы, вызванные заражением CGMMV. Таким образом, даже если растения или прививочные черенки по изобретению при выращивании на поле в низкой степени заражены CGMMV, то такие растения будут давать плоды без симптомов CGMMV. Эти плоды обладают рыночной ценностью, и, таким образом, можно снизить или предотвратить потери урожая.

В соответствии с еще одним частным вариантом осуществления изобретения предлагаемый способ борьбы с заражением CGMMV является способом получения семян, обладающих устойчивостью к CGMMV, при этом указанный способ, помимо снижения, предотвращения потерь урожая или борьбы с потерями урожая в результате заражения CGMMV плодов растений, включает дополнительный этап d) получения семян плодов растений, собранных согласно этапу с). При необходимости, предлагаемый способ получения семян, обладающих устойчивостью к CGMMV, включает дополнительный этап e), в ходе которого из семян, полученных на этапе d), выращиваются растения, и осуществляют тестирование указанных растений на устойчивость к CGMMV, при этом

устойчивость к CGMMV предпочтительно анализируют фенотипически, например, путем визуальной оценки симптомов, и/или генотипически, например, путем генотипирования маркеров SNP. Семена получают путем опыления цветов культурных диплоидных или тетраплоидных арбузов по изобретению, например, с использованием их собственной пыльцы (самоопыление) или пыльцой других растений (перекрестное опыление). Если диплоидные или тетраплоидные растения культурного арбуза являются гомозиготными по фрагментам интрогрессии, семена S1 (полученные путем самоопыления) также будут гомозиготными, а семена F1 (полученные путем перекрестного опыления) могут быть гомозиготными или гетерозиготными, в зависимости от того, получен ли пыльца из растения, которое также содержит фрагменты интрогрессии или у которого отсутствуют фрагменты интрогрессии.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к семенам, обладающим устойчивостью к CGMMV, которые получены или могут быть получены способом получения семян, обладающих устойчивостью к CGMMV, по настоящему изобретению. Указанные семена содержат, по меньшей мере, одну рекомбинантную хромосому в соответствии с описанием. Предпочтительно, растения, выращенные из таких семян, также обладают устойчивостью к CGMMV (степень выраженности симптомов CGMMV у таких растений составляет 4 балла или 3 балла) из-за того, что фрагмент интрогрессии содержит QTL. Это будет в том случае, если растения содержат доминантные QTL: QTL7.1 и/или QTL9.1. Чтобы был выражен фенотип устойчивости к CGMMV, рецессивные QTL должны быть в гомозиготной форме.

В соответствии с одним аспектом изобретения семена, обладающие устойчивостью к CGMMV, полученные из растений по изобретению, не содержат вируса CGMMV, т.е. вирус CGMMV невозможно обнаружить в таких семенах, например, путем ОТ-кПЦР. Таким образом, в соответствии с одним аспектом изобретения присутствие одного или нескольких QTL по изобретению обеспечивает то, что вирус CGMMV не передается семенам, полученным из таких растений. В соответствии с одним аспектом изобретения растение культурного арбуза, содержащее QTL7.1 и/или QTL9.1, будет давать плоды с семенами без CGMMV.

Растение и части растений по изобретению могут применяться для различных целей.

Применение одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP1, SNP1, SNP3, SNP4, SNP5, и SNP6; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP7, SNP8 и SNP9; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP10, SNP11 и SNP12; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24, для идентификации растения, части или клетки *Citrullus*, которые обладают устойчивостью к CGMMV, предпочтительно растения, части или клетки растения *Citrullus colocynthis*, которые обладают устойчивостью к CGMMV, или растения, части или клетки *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*, которые обладают устойчивостью к CGMMV.

Применение одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP1, SNP1, SNP3, SNP4, SNP5, и SNP6; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP7, SNP8 и SNP9; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP10, SNP11 и SNP12; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24, для идентификации или детекции QTL, придающего устойчивость к CGMMV, или фрагмента интрогрессии, содержащего QTL, придающий устойчивость к CGMMV, у растения, части или клетки *Citrullus*, предпочтительно у растения, части или клетки растения *Citrullus colocynthis*, которые обладают устойчивостью к CGMMV, или у растения, части или клетки *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*, которые обладают устойчивостью к CGMMV.

Применение одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP1, SNP1, SNP3, SNP4, SNP5 и SNP6; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP7, SNP8 и SNP9; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP10, SNP11 и SNP12; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24, для идентификации или детекции растения, части или клетки растения, которые содержат QTL, придающий устойчивость к CGMMV, или фрагмент интрогрессии, содержащий QTL, придающий устойчивость к CGMMV, при этом растение, часть или клетка

растения представляют собой растение, часть или клетку растения *Citrullus*, предпочтительно растение, часть или клетку растения *Citrullus colocynthis* или растение, часть или клетку растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*.

Применение одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP1, SNP1, SNP3, SNP4, SNP5 и SNP6; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP7, SNP8 и SNP9; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP10, SNP11 и SNP12; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18; и/или одного или нескольких маркеров, выбранных из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24, для интрогрессии устойчивости к CGMMV (или QTL, придающего устойчивость к CGMMV) в растение культурного арбуза, восприимчивое к CGMMV.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к применению растения *Citrullus colocynthis* или клетки растения *Citrullus colocynthis* по настоящему изобретению для получения растения *Citrullus lanatus*, обладающего устойчивостью к CGMMV, предпочтительно для получения растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* или для получения клетки растения *Citrullus lanatus*, предпочтительно для получения клетки растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*. В предпочтительном варианте осуществления изобретения растение *Citrullus colocynthis* или клетка растения *Citrullus colocynthis* по настоящему изобретению используются для получения растений *Citrullus lanatus*, обладающих устойчивостью к CGMMV, по настоящему изобретению.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к применению пыльцы растения *Citrullus colocynthis* по настоящему изобретению для опыления растения *Citrullus lanatus*, предпочтительно растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к применению растения *Citrullus* или клетки растения *Citrullus* по настоящему изобретению для получения привитого растения, предпочтительно привитого растения по настоящему изобретению.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к применению генетически немодифицированных растений *Citrullus* или клеток растения *Citrullus*

по настоящему изобретению для получения семян, обладающих устойчивостью к CGMMV.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к применению семян, внесенных в базу под номером доступа NCIMB 42624, для получения растения *Citrullus*, обладающего устойчивостью к CGMMV, предпочтительно генетически немодифицированного растения *Citrullus*, обладающего устойчивостью к CGMMV, по настоящему изобретению.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к применению генетически немодифицированных растений *Citrullus* или клеток растения *Citrullus* по настоящему изобретению для получения плодов, предпочтительно плодов по настоящему изобретению.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к применению генетически немодифицированных растений *Citrullus* или клеток растения *Citrullus* по настоящему изобретению для получения бессемянных плодов, предпочтительно бессемянных плодов по настоящему изобретению.

Термин «включать» и «содержать» и их формы не имеют ограничительного характера; это подразумевает то, что перечисленные наименования включены в указанную группу, при этом указанная группа также может включать иные наименования, которые не были прямо упомянуты. Кроме того, при упоминании по тексту настоящего документа какого-либо элемента в единственном числе подразумевается также, что может присутствовать несколько таких элементов, за исключением случаев, когда из контекста очевидно следует, что присутствует лишь один такой элемент. Таким образом, например, использование термина в единственном числе означает «по меньшей мере один X», например, выражение «клетка растения» относится также к нескольким клеткам растения и т.д. Аналогичным образом, термины «плод» или «растение» также относятся к множеству плодов и растений.

В соответствии с одним аспектом растения, части растения и клетки растения по настоящему изобретению получены не исключительно посредством биологического процесса в соответствии с определением в правиле 28(2) ЕРС (Европейской патентной конвенции). Например, причинный ген QTL *C. colocynthis*, например, QTL7.1 или QTL9.1, могут быть определены, например,

путем точного картирования и/или секвенирования области хромосомы 7 или хромосомы 9, в которой находится QTL, может быть определен ортологичный ген культурного арбуза, и может осуществляться мутация ортологичного гена культурного арбуза, например, с помощью УФ-мутагенеза, ЭМС-мутагенеза, модификации генома на основе системы CRISPR-Cas и т.д. Таким образом может быть получено растение арбуза, обладающее устойчивостью к CGMMV, содержащее модифицированный ген, например, лежащий в основе QTL7.1 или QTL9.1. В соответствии с этим аспектом упоминания в настоящем документе фрагментов интрогрессии из *C. colocynthis* относятся к растениям арбуза, устойчивым к CGMMV, поскольку они содержат мутантный ген, полученный путем индуцированной мутации ортологичного гена арбуза *C. colocynthis*, присутствующий в локусе QTL7.1 или локусе QTL9.1 (или в любом другом локусе).

В соответствии с одним аспектом изобретения QTL, придающие устойчивость к CGMMV, описанные в настоящем документе, не являются QTL, которые получены/могут быть получены из образцов *C. colocynthis* PI386015, PI388770, PI525082 и PI537300 из основной коллекции Министерства сельского хозяйства США.

Депонирование семян

Семена диплоидных растений *Citrullus colocynthis*, обладающих устойчивостью к CGMMV, были депонированы компанией Nunhems B.V. в соответствии с Будапештским договором под номером доступа NCIMB 42624 в NCIMB Ltd., Баксберн, Абердин, AB21 9YA, Шотландия, 27.01.2016 г.

В течение периода рассмотрения настоящей заявки доступ к внесенным в базу данных образцам будет предоставляться лицам, определяемым Руководителем Ведомства по патентам и товарным знакам США, по запросу.

По требованию заявителя образцы биологического материала и любого материала, полученного из него, могут передаваться лишь уполномоченному эксперту в соответствии с Правилom 32(1) ЕРС 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 отпала, отклонена, отозвана или считается отозванной.

С учетом положений Раздела 37 Свода Федеральных Правил США, § 1.808(b), любые ограничения, накладываемые вносящим лицом в отношении общедоступности внесенного в базу данных материала, после предоставления патента в безотзывном порядке снимаются путем предоставления доступа к внесенному в базу данных материалу. 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 фигур

Фиг. 1: растение NCIMB 42624, которое используют для получения прививочных черенков, и зараженное CGMMV растение *Citrullus lanatus* сорт Sugar Baby (изображение сделано через 25 dpi (дней после инокуляции)), которое используют для получения подвоя (A); прививочный черенок из NCIMB 42624,

привитый на подвой из зараженного CGMMV растения *Citrullus lanatus* сорт Sugar Baby – изображение сделано через 140 dpi, на прививочном черенке симптомы не наблюдаются (4 балла) (В); зараженное CGMMV растение *Citrullus lanatus*, сорт Sugar Baby – изображение сделано через 140 dpi, на растении наблюдаются сильные симптомы (С);

Фиг. 2: пример растений *Citrullus*, на которых наблюдаются сильные симптомы, деформация листьев, пузырчатость и заметная мозаичность после инокуляции CGMMV, степень выраженности симптомов составляет 1 балл после визуальной оценки симптомов в соответствии с описанием в разделе «Общие методы».

Фиг. 3: пример растений *Citrullus*, на которых наблюдаются умеренные симптомы, умеренная деформация листьев, однако, заметная мозаичность после инокуляции CGMMV, степень выраженности симптомов составляет 2 балла после визуальной оценки симптомов в соответствии с описанием в разделе «Общие методы».

Фиг. 4: пример растения *Citrullus*, на котором наблюдаются слабо выраженные симптомы, малозаметная мозаичность и небольшое количество светлых пятен после инокуляции CGMMV, степень выраженности симптомов составляет 3 балла после визуальной оценки симптомов в соответствии с описанием в разделе «Общие методы».

Фиг. 5: пример плода, на котором наблюдаются сильные симптомы CGMMV, плод получен от восприимчивого к CGMMV растения *Citrullus*, которое было инокулировано CGMMV.

Фиг. 6: пример плода, на котором симптомы не наблюдаются, плод получен от обладающего устойчивостью к CGMMV растения *Citrullus*, которое было инокулировано CGMMV.

Описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO:6 относятся к последовательностям хромосомы 1, связанным с QTL1.1 из *C. colocynthis*, содержащим донорский нуклеотид SNP1 – SNP6, соответственно;

SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 9 относятся к последовательностям хромосомы 4, связанным с QTL4.1 из *C. colocynthis*, содержащим донорский нуклеотид SNP7 – SNP9, соответственно;

SEQ ID NO: 10 - SEQ ID NO: 12 относятся к последовательностям хромосомы 5, связанным с QTL5.2 из *C. colocynthis*, содержащим донорский нуклеотид SNP10 – SNP12, соответственно;

SEQ ID NO: 13 - SEQ ID NO: 18 относятся к последовательностям хромосомы 7, связанным с QTL7.1 из *C. colocynthis*, содержащим донорский нуклеотид SNP13 - SNP18, соответственно;

SEQ ID NO: 19 - SEQ ID NO: 24 относятся к последовательностям хромосомы 9, связанным с QTL9.1 из *C. colocynthis*, содержащим донорский нуклеотид SNP19 – SNP24, соответственно;

SEQ ID NO 25: обратный праймер, используемый при ОТ-ПЦП для детекции РНК CGMMV в ткани растения.

SEQ ID NO 26: прямой праймер, используемый при ОТ-ПЦП для детекции РНК CGMMV в ткани растения.

SEQ ID NO 27: смысловой праймер, используемый при количественной ОТ-ПЦП для количественного определения РНК CGMMV в ткани растения.

SEQ ID NO 28: антисмысловой праймер, используемый при количественной ОТ-ПЦП для количественного определения РНК CGMMV в ткани растения.

SEQ ID NO 29: олигонуклеотидный зонд, используемый при количественной ОТ-ПЦП для количественного определения РНК CGMMV в ткани растения.

ПРИМЕРЫ

Общие методы

Пример: Механическая инокуляция листьев для оценки устойчивости к CGMMV

Пункт 1: Подготовка инокулята CGMMV для инфицирования растения

Инокулят для инфицирования растений *Citrullus* был получен из восприимчивых к CGMMV растений огурца (например, из сорта Sheila, компании Nunhems B.V.), зараженных штаммом Ve459 (Национальный исследовательский совет Италии, Турин) европейского типа. С растений огурца были сняты свежие молодые листья с заметными симптомами заражения CGMMV (симптомные листья). На 1 грамм симптомных листьев огурца добавили 5 мл охлажденного (5

°C) 0,03 М фосфатного буфера, и на 1 грамм листа огурца добавили 0,05 г активированного угля и 0,1 г диатомовой земли. Листовой материал измельчили пестиком в ступке, охлажденный до температуры льда во время и после измельчения.

Для проверки того, обладают ли растения *Citrullus* устойчивостью к CGMMV рекомендуется использовать свежеприготовленный инокулят из свежеизмельченного материала.

Пункт 2: Инфицирование растений (*Citrullus*) CGMMV

Инокуляцию листьев осуществляли путем втирания инокулята в первый настоящий лист молодых саженцев. Таким образом, инокуляцию сеянцев растений (*Citrullus*) инокулятом, приготовленным в соответствии с описанием в пункте 1 раздела «Общие методы», осуществляли после того, как распустился первый настоящий лист (приблизительно через 15 - 20 дней после посева). Второй раз сеянцы инокулировали через 4 - 5 дней после первой инокуляции. Контрольные сеянцы инокулировали только буферным раствором (имитационная инокуляция). Инокулированные растения хранили в помещении с освещением непрямым солнечным светом и не подвергали воздействию прямого солнечного света до второй инокуляции. Температурный режим для инокулированных сеянцев: 18 °C в ночное время и 25 °C в дневное время с продолжительностью светового дня 12 - 14 часов. Осуществляли инокуляцию, по меньшей мере, 10 растений на генотип (например, генотип устойчивости к CGMMV, генотип восприимчивых контрольных растений), проводили, по меньшей мере, два параллельных опыта. Кроме того, для нескольких растений осуществлялась имитационная инокуляция.

Пункт 3: Оценка симптомов заболевания

После инокуляции осуществлялась оценка растений на наличие симптомов и/или наличия вируса CGMMV в следующие моменты времени после первой инокуляции (dpi, дни после инокуляции):

- 15 dpi
- 30 dpi
- 45 dpi
- 60 dpi

В случае необходимости может осуществляться оценка плодов на наличие симптомов и/или наличие CGMMV, например, через 140 dpi или позже.

Контрольные растения

Во все серии опытов должны быть включены контрольные растения. Важно включить растения (*Citrullus*), о которых известно, что они являются восприимчивыми к CGMMV (например, растения *Citrullus lanatus*, коммерческий сорт Sugar Baby) в качестве положительного контроля для проверки эффективности заражения CGMMV. Предпочтительно, по меньшей мере, у 95% положительных контрольных растений наблюдаются сильные симптомы (1 балл) на листьях через 20 dpi и предпочтительно у плодов таких растений также наблюдаются сильные симптомы. Кроме того, необходимо включить отрицательные контрольные растения, т.е. растения, восприимчивые к CGMMV, для которых осуществлялась имитационная инокуляция только фосфатным буфером. Кроме того, в серии опытов могут быть включены неинокулированные растения. У отрицательных контрольных растений на листьях или в плодах в любое время не должны наблюдаться симптомы заражения CGMMV, и у растений после имитационной инокуляции не должен обнаруживаться белок и/или РНК CGMMV.

Визуальная оценка симптомов CGMMV на листьях

При визуальной оценке симптомы на листьях классифицируются в соответствии со следующей шкалой:

1 балл: Сильные симптомы: деформация листа, пузырчатость и заметная мозаичность (пример приведен на Фиг. 2)

2 балла: Умеренные симптомы: незначительная деформация листа, однако, заметная мозаичность (пример приведен на Фиг. 3)

3 балла: Слабо выраженные симптомы: незначительная мозаичность и небольшое количество светлых пятен (пример приведен на Фиг. 4)

4 балла: Отсутствие симптомов (пример приведен на Фиг. 1B)

Обнаружение вируса в инокулированной растительной ткани: Метод ИФА

Для того, чтобы показать наличие или отсутствия CGMMV у всех растений, степень выраженности симптомов у которых составляла 4 балла на основе визуальной оценки, проводили анализ методом ИФА после второй оценки (30 dpi).

В зависимости от результатов, полученных путем анализа методом ИФА, протестированные растения были классифицированы следующим образом:

Отрицательный по методу ИФА

Положительный с низким уровнем вируса, если коэффициент поглощения < 0,5

Положительный по методу ИФА, если коэффициент поглощения > 0,5

Оценка наличия или отсутствия CGMMV в растительном материале также может осуществляться путем ОТ-кПЦР, или может осуществляться количественная оценка путем детекции с помощью ОТ-кПЦР (см. раздел «Общие методы», пункт 4) и путем «тканевой печати» или дот-блоттинга (раздел «Общие методы», пункт 5).

Пункт 4: Обнаружение вируса в инокулированной растительной ткани:
Обнаружение CGMMV в растительной ткани путем ПЦР

Присутствие CGMMV в растительном материале определяли путем полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), а для количественного определения CGMMV в растительном материале использовалась количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (ОТ-кПЦР, TaqMan). См. также работу Hongyun et al., 2008, J Virological Methods 149, 326-329, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки.

а) Экстракция РНК из растительного материала

Ткань листьев (200 мг) измельчали с помощью пестика в ступке в жидком азоте до мелкого порошка и переносили в стерильную пробирку для микроцентрифугирования. Тотальную РНК экстрагировали с использованием реагента Trizol (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Полученный осадок РНК ресуспендировали в 30 мкл воды, обработанной DEPC, и хранили при -80 °C. Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop Technologies).

б) ПЦР с использованием обратной транскриптазы (RT-PCR)

Олигонуклеотиды, используемые для ОТ-кПЦР были разработаны на основании гена белка оболочки CGMMV и 3'-некодирующей области (NCR) нуклеотидной последовательности, доступной из базы данных EMBL. Первая

цепочка кДНК была синтезирована с использованием обратной транскриптазы SuperScript II (Invitrogen) с обратным праймером: 5'-TTG CAT GCT GGG CCC CTA CCC GGG GAA AG-3' (SphI; SEQ ID NO 25). Для ПЦР использовался праймер со следующей последовательностью: 5'-CCG AAT TCA TGG CTT ACA ATC CGA TCA C-3' (EcoRI; SEQ ID NO 26). Использовалась следующая схема термоциклирования: 3 мин. при 94 °C, 35 циклов по 30 сек. при 94 °C, 45 сек. при 53 °C, 1 мин. при 72 °C после чего следовала финальная инкубация в течение 7 мин. при 72 °C.

Необходимые продукты ПЦР длиной 700 пар оснований клонировали в плазмиду pGEM-3Zf, и положительные клоны секвенировали в обоих направлениях с помощью автоматического секвенатора ДНК ABI 3730 DNA для подтверждения амплифицированной последовательности, которая должна быть получена из РНК вируса CGMMV.

с) ОТ-кПЦР

Праймеры и зонд для анализа TaqMan были разработаны с использованием программного обеспечения Primer Express (Applied Biosystems, версия 2.0) согласно процедуре в инструкции производителя. Использовали специфические праймеры для CGMMV: 5'-GCA TAG TGC TTT CCC GTT CAC-3' (sense; SEQ ID NO 27) и 5'-TGC AGA ATT ACT GCC CAT AGA AAC-3' (antisense; SEQ ID NO 28). Использовался зонд 5'-CGG TTT GCT CAT TGG TTT GCG GA-3' (SEQ ID NO 29), меченный 6-карбоксифлуоресцеином (FAM), а 3'-конец был мечен *N,N,N',N'*-тетраметил-6-карбоксиродамино (TAMRA).

Все реакции проводили в конечном объеме 50 мкл, содержащем: 25 мкл 2× Master Mix без UNG, 1,25 мкл 40× смеси MultiScribe и ингибитора РНазы, 1 мкл прямого праймера (20 мкМ), 2 мкл обратного праймера (20 мкМ), 0,5 мкл зонда (20 мкМ), 1 мкл тотальной РНК или 5 мкл транскриптов РНК, и объем воды, обработанной диэтилпиокарбонатом (DEPC), отрегулировали матрицей. Термоциклирование осуществляли с использованием LightCycler® 96 (Roche LifeScience) в соответствии со следующим порядком: 30 мин. при 48 °C, 10 мин. при 95 °C, 40 циклов по 15 сек при 95 °C, 1 мин. при 60 °C.

Конверсию микрограммовых количеств одноцепочечной РНК в пикомоли и количества молекул РНК осуществляли, как описано Olmos et al. (2005, J Virol

Methods 128(1-2), 151-155). Были получены десятикратные серийные разведения транскриптов из 5×10^{12} до 50 копий на 5 мкл, их разделили на аликвоты и хранили при -80°C . Разведения с 5×10^8 до 5×10^0 были амплифицированы с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Стабильная амплификация может наблюдаться при использовании всего 50 копий РНК-транскриптов при трех повторениях анализа.

Пункт 5: Детекция CGMMV путем гибридизации («тканевая печать» или дот-блоттинг)

Подготовка мембраны для «тканевой печати»

Надев перчатки, необходимо подготовить нейлоновую мембрану, обрезав ее до нужного размера стерилизованными ножницами, и поместить сверху сеточный шаблон микропланшета (фактический размер зависит от типа используемого образца). Необходимо сделать поперечный надрез на стебле листа чистым стерильным скальпелем и слегка вдавить его в одну из решеток, пока весь сок не впитается. Необходимо делать новый разрез для каждой последующей печати. Для очищенных образцов ДНК или РНК достаточно 1 мкл образца.

Необходимо включить здоровые отрицательные контроли и известно зараженные положительные контроли соответствующих видов растений. Также необходимо включить очищенный вирус или его амплифицированный продукт ПЦР в качестве положительного контроля. Подождите, пока мембрана полностью высохнет, и закрепите нуклеиновые кислоты на мембране, используя ультрафиолетовый свет при $0,120 \text{ Дж/см}^2$ (перекрестная связь). Храните сухие мембраны, запечатанные в полиэтиленовые пакеты, при комнатной температуре.

Подготовка мембраны для дот-блоттинга

Образец ткани взвешивают и измельчают в соответствующем экстракционном буфере при соответствующем разведении. Возьмите 10-20 мкл экстракта с помощью микропипетки и аккуратно снимите наконечник, убедитесь, что жидкость внутри не поднимается и что отсутствует воздушная пробка. Слегка (быстро) коснитесь мембраны наконечником пипетки, при этом сетку микропланшета используют в качестве направляющего приспособления, и нанесите экстракт на мембрану (оттиск). Объем полученных точек составляет приблизительно 250 нл, в каждую позицию сетки можно поместить 4 шт. Используйте 2-4 точки на образец, в зависимости от назначения мембраны и качества гибридизационного зонда.

Для контролей оттиск, фиксацию и хранение осуществляют в соответствии с описанием выше для мембран при «тканевом оттиске».

Печать на мембраны может производиться дважды в качестве резервной копии на случай, если возникнут проблемы во время обработки.

Предварительная гибридизация мембран

После подготовки мембраны в соответствии с описанием выше для «тканевой печати» или дот-блоттинга, с использованием плоского пинцета поместите ее в гибридизационную пробирку. Добавьте раствор для предварительной гибридизации (DIG Easy + 1% блокирующего агента) при комнатной температуре (количество достаточное, чтобы закрыть мембрану; например, 20 мл для мембраны 8 x 12 см, 10 мл для мембраны 8 x 6 см). Инкубируйте в течение приблизительно 2 ч. при 54 ° С при вращении в гибридизационной печи. Необходимо обеспечить, чтобы с этого момента мембрана не высыхала.

Гибридизация мембран

Приготовьте свежий раствор для гибридизации (раствор DIG Easy + 1% блокирующего агента) с использованием замороженных готовых растворов зонда с получением 80-120 нг зонда на мембрану 8 x 12 см. Предварительно нагрейте раствор для гибридизации в течение 10 мин. при 100°C (для ДНК-зондов) или при 65°C для РНК-зондов. Удалите раствор для предварительной гибридизации с мембран и добавьте разбавленный раствор зонда к мембранам. Инкубируйте в течение ночи при 54 °С при вращении в гибридизационной печи.

Промывка мембран

Удалите гибридизационный раствор с мембран и выполните следующие действия в гибридизационной пробирке при вращении в гибридизационной печи:

1. Промойте 2х гибридизационным объемом в 6х SSC + 1% SDS в 40 мин. при температуре гибридизации.
2. Удалите жидкость и повторите промывание.
3. Перенесите мембрану в лоток для детекции + Раствор 1 (избегайте высыхания мембраны).

Детекция

Перенесите мембрану в лоток немного большего размера, чем мембрана. С этого момента процесс осуществляют при комнатной температуре и при осторожном перемешивании. Отрегулируйте объемы раствора в соответствии с объемом лотка и размером мембраны (например, 600 мкл/см² или 50 мл для мембраны 8 x 12 см). Важно, чтобы мембрана в ходе следующих этапов мембрана не высыхала:

Промойте мембрану с использованием следующих растворов:

1. Раствор I, 1 мин.
2. Промывочный раствор, 5 мин.
3. Раствор I, 1 мин.
4. Раствор II, 30 мин. (подготовить 2х объем в мензурке)
5. Раствор II (с предыдущего этапа) + Anti-DIG(1:20000), 30 мин.
6. Промывочный раствор, 15 мин.
7. Промывочный раствор, 15 мин.
8. Раствор I, 1 мин.
9. Раствор III, по меньшей мере, 5 мин.

Разведите хемилюминесцентный субстрат щелочной фосфатазы (CDP-Star (1: 100) в 600 мкл Раствора III.

Поместите мембрану между двумя слоями ацетата и равномерно распределите субстрат по мембране с помощью микропипетки (1 капля = 4 малых квадранта). Смешайте, поднимая и опуская верхний ацетат несколько раз, следя за тем, чтобы не было пузырьков воздуха. Инкубируйте в течение 5 мин. в темноте (например, накройте алюминиевой фольгой). Удалите избыток субстрата, нажав на фильтровальную бумагу и запаяв края ацетата.

Для получения указанных в настоящем документе растворов необходимы следующие реагенты:

Реагенты:

Блокирующий агент (Roche)

Малеиновая кислота.

NaCl

Tris-HCL

Tween 20

Anti-Dig (Roche).

CDP-Star (Roche).

Растворы:

Раствор I: 0,1 М малеиновой кислоты, 0,15 М NaCl, значение pH 7,5

Раствор II: 1% блокирующего агента в Растворе I.

Раствор III: 0,1 М Tris-HCl pH 9,5, 0,1 М NaCl

Промывочный раствор: 0.3% Tween 20 в Растворе I

Получение цифровых изображений

Поместите камеру в камеру цифрового формирования изображений и сделайте одну фотографию с обычным освещением (Nikon Control Pro2, объектив 50 мм, ручное управление с включенной дистанционной съемкой, ISO шаг 0,3, светочувствительность 6400, флажок шумоподавления при длительной выдержке установлен, камера предварительно охлаждена, по меньшей мере, 30 мин., $<10^{\circ}\text{C}$).

Закройте камеру, ручная выдержка, диафрагма — 1,4. С использованием функции длительной выдержки DSLR_Bot, установите время экспозиции 5 мин. 3 сек. Убедитесь, что инфракрасный кабель полностью вставлен, выходной уровень максимален и нажмите «Пуск» (должен быть слышен щелчок). Камера снимает одно изображение с открытой диафрагмой и второе с закрытой диафрагмой для уменьшения шума – общее время 10 минут 6 секунд для каждой фотографии с выдержкой 5 мин. 3 сек.

Одна фотография с 5-минутной экспозицией примерно эквивалентна обычной фотографии с 2-4-часовой экспозицией. Если требуется более сильный сигнал, можно сделать 10-минутную цифровую экспозицию (что эквивалентно обычному снимку с экспозицией в течение ночи). Для внешней диагностики или в случае слабого сигнала рекомендуется обычный снимок с экспозицией в течение ночи.

Пункт 6: Прививка растений Citrullus

Подвой были получены от инокулированных CGMMV растений Citrullus lanatus сорт Sugar Baby или сорт Ercole (Nunhems B.V.) возрастом 15 дней. Прививочные черенки были получены от растений NCIMB 42624 возрастом 20 дней. Прививка черенков на подвой осуществлялась путем косого среза на стебле

подвоя и на черенка и соединения их таким образом, чтобы соединить их сосудистую систему. После заживления растений при высокой влажности привитые растения переносили в теплицу.

ПРИМЕРЫ — результаты

Результаты, пункт 1: Идентификация растений *Citrullus*, обладающих устойчивостью к CGMMV

В теплице или в климатической камере выращивали группу различных образцов рода *Citrullus*, зараженных CGMMV, в соответствии с методом, описанным в настоящем документе в разделе «Общие методы». Инокулят для инфицирования CGMMV получали в соответствии с пунктом 1 раздела «Общие методы», и осуществлялась визуальная оценка инокулированных растений на наличие симптомов в соответствии с описанием в пункте 3 раздела «Общие методы». Было идентифицировано одно растение *Citrullus colocynthis* без симптомов заражения CGMMV (4 балла). Самоопыление растения осуществлялось несколько раз, и отобранное растение, обладающее устойчивостью к CGMMV, размножали для получения семян для депонирования семян в соответствии с Будапештским договором с номером доступа NCIMB 42624.

Результаты, пункт 2: Получение растений, обладающих устойчивостью к CGMMV, и их анализ

Растения *Citrullus lanatus*

Для опыления элитных линий *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* использовали пыльцу из NCIMB 42624. Растения F1 выращивали из семян, полученных в результате скрещивания, для дальнейшего анализа в отношении устойчивости к CGMMV.

Также были получены растения F2 путем самоопыления растений F1. Следует отметить, что получение семян F2 и растений, полученных обратным скрещиванием из растений F1 (NCIMB 42624 x элитные *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*), представляло определенные трудности. Развилось лишь несколько плодов, при этом большая часть семян в таких плодах были пустыми.

Растения F1 тестировали на устойчивость к CGMMV и присутствие вируса CGMMV с использованием метода механической инокуляции листьев, описанного

в разделе «Общие методы», пункты 1-3 и ОТ-кПЦР, как описано в разделе «Общие методы», пункт 4.

Были получены следующие результаты: У растений с имитационной инокуляцией симптомы не наблюдались. Положительный контроль, сорт Sugar Baby, степень выраженности симптомов CGMMV у растений составила 1 балл. Растения F1 обладали устойчивостью к CGMMV, и симптомы у них отсутствовали (4 балла)

Таблица 2:

Количественный анализ РНК CGMMV RNA в растениях осуществляли через 15 dpi, 30 dpi и 60 dpi для каждой группы растений:

Растение	Средняя концентрация (нг/мкл)		
	15 dpi	35 dpi	60 dpi
Имитационная инокуляция, сорт Sugar Baby	-	-	-
Имитационная инокуляция, F1	-	-	-
Sugar Baby, инокулированные растения_параллельный опыт 1	1.4	3.35×10^{-2}	1.26
Sugar Baby, инокулированные растения_параллельный опыт 2	2.1	1.53×10^{-2}	0.41
Среднее значение для Sugar Baby, инокулированные растения	1.75	2.44×10^{-2}	0.83
F1, инокулированные растения_параллельный опыт 1	1.2×10^{-4}	-	1.17×10^{-5}
F1 инокулированные растения_параллельный опыт 2	-	1.09×10^{-4}	3.68×10^{-5}
F1 инокулированные растения_параллельный опыт 3	5.3×10^{-5}	-	1.86×10^{-5}
F1 инокулированные растения_параллельный опыт 4	7.2×10^{-6}	1.81×10^{-6}	1.03×10^{-5}
Среднее значение для F1, инокулированные растения	4.5×10^{-5}	2.7×10^{-5}	1.93×10^{-5}

Результаты ОТ-кПЦР выше показывают количество РНК CGMMV в растительном материале. «Имитационная инокуляция» означает растения, инокулированные буферным раствором, без CGMMV. «Инокулированный» означает растения, которым инокулировали CGMMV в соответствии с описанием в разделе «Механическая инокуляция», пункты 1 – 3 раздела «Общие методы» «Sugar Baby» означает восприимчивые растения вида *Citrullus lanatus* сорт Sugar Baby. «F1» означает растения, полученные в результате скрещивания NCIMB 42624 x элитные линии *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*. «Параллельный опыт» означает опыт с различными растениями, при этом каждый параллельный опыт состоит из группы из 6 растений.

ОТ-кПЦР представляет собой высокочувствительный метод детекции молекул РНК CGMMV в образцах растений (Hongyun et al., 2008, J Virological Methods 149, 326-329). Как видно из приведенной выше таблицы 2, с использованием высокочувствительного метода ОТ-кПЦР, РНК CGMMV может быть обнаружена во всех анализируемых растениях практически во все моменты времени (15 dpi, 30 dpi и 60 dpi). Из данных, приведенных в Таблице 2, можно с очевидностью заключить, что количество РНК CGMMV RNA в растениях F1, полученных в результате скрещивания между растениями NCIMB 42624 x элитными линиями *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* в десятки раз ниже, чем количество РНК CGMMV RNA в растениях *Citrullus lanatus* сорта Sugar Baby, восприимчивых к CGMMV. Количество было во все моменты времени ниже $5,0 \times 10^{-5}$ нг/мкл в среднем из четырех параллельных опытов и постепенно снижалось в более поздние моменты времени. У восприимчивых контрольных растений среднее значение составляло, по меньшей мере, 0,02 нг/мкл (через 35 dpi), однако, через 15 dpi и 60 dpi уровень был еще выше, более 1,7 нг/мкл и более 0,8 нг/мкл соответственно.

На основании визуальной оценки симптомов очевидно, что растения F1 обладают устойчивостью к CGMMV, так как у них отсутствуют симптомы после инокуляции CGMMV (4 балла). Известно, что сорт Sugar Baby *Citrullus lanatus* является восприимчивым к CGMMV, и действительно, у растений этого сорта наблюдаются сильные симптомы (1 балл) после инокуляции CGMMV. Таким образом, очень низкие количества CGMMV в растениях F1, которые приведены в таблице выше, с очевидностью демонстрируют, что устойчивость к CGMMV

коррелирует со значительным уменьшением РНК CGMMV в соответствующем растительном материале. У растений F2 также не наблюдались симптомы CGMMV (4 балла) при тестировании согласно методу механической инокуляции листьев, описанному в разделе «Общие методы», пункты 1-3. Также снаружи или внутри плодов, полученных на растениях F2, отсутствовали какие-либо симптомы. Растения F2, у которых отсутствовали симптомы (4 балла), также имели чрезвычайно низкое количество титра вируса в листьях (на основании данных ОТ-кПЦР, не показаны), значительно ниже, чем у восприимчивых контрольных растений.

Привитые растения

Прививочные черенки от растений NCIMB 42624 прививали на зараженные CGMMV подвои, полученные из коммерческих растений *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* (сорт Sugar Baby) или из гибридов *Curcubita maxima* x *Curcubita moshata* сорт Ercole (Nunhems BV) в соответствии со способом, описанным в настоящем документе в разделе «Общие методы».

Анализ растений

Осуществляли анализ выращенных в теплице растений F1 (NCIMB 42624 x *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*, элитные линии), привитых растений, состоящих из прививочного черенка от NCIMB 42624 и зараженного подвоя от *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*, сорт Sugar Baby (NCIMB42624 – Sugar Baby), и привитых растений, состоящих из прививочного черенка от NCIMB 42624 и зараженного подвоя от гибрида *Curcubita maxima* x *Curcubita moshata* сорт Ercole (NCIMB42624 – Ercole). Непривитые растения (NCIMB42624, F1, Sugar Baby) инокулировали CGMMV путем механической инокуляции листьев. Привитые растения получали с использованием подвоя растения, инфицированного CGMMV, сорт Sugar Baby или Ercole в соответствии с описанием в разделе «Общие методы».

При визуальной оценке ни у одного из растений на листьях не были обнаружены симптомы CGMMV. Степень выраженности симптомов на основе визуальной оценки у всех растений составляла 4 балла в соответствии с описанием в настоящем документе в разделе «Общие методы», пункт 3.

Кроме того, все растения давали плоды, которые снаружи выглядели нормально и не имели признаков испорченной или мокрой мякоти внутри. Репрезентативное изображение плода такого растения приведено на Фиг. 6.

Практически все непривитые растения *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*, сорт Sugar Baby, инокулированные CGMMV имели явные симптомы заболевания, при этом степень выраженности симптомов на основе визуальной оценки составляла 1 или 2 балла в соответствии с описанием в настоящем документе в разделе «Общие методы», пункт 3. У плодов этих растений наблюдались серьезные повреждения мякоти. Репрезентативное изображение плода такого растения приведено на Фиг. 5.

Осуществляли дополнительный анализ растений *Citrullus lanatus* F1 и привитых растений (NCIMB42624 – Sugar Baby и NCIMB42624 – Ercole) на присутствие РНК вируса CGMMV в листьях путем дот-блот гибридизации (*) в соответствии с описанием в настоящем документе в разделе «Общие методы», пункт 5, и путем ОТ-ПЦР (**), в соответствии с описанием в настоящем документе в разделе «Общие методы, пункт 4 b). Полученные результаты в таблице ниже.

Таблица 3:

Растение-хозяин	dpi				
	14(*)	30(**)	40(*)	60(**)	90(*)
NCIMB 42624	+/-	+/-	–	–	–
F1 (NCIMB 42624 x элитные линии)	+/-	Не испытано	–	–	–
Привитое растение (NCIMB 42624 – Ercole)	–	Не испытано	–	Не испытано	Не испытано
Привитое растение (NCIMB 42624 – «Sugar Baby»)	–	Не испытано	–	+/-	–
Sugar baby (положительный контроль)	+	+	+	+	+

В Таблице 3 выше приведены результаты детекции РНК CGMMV в листьях растений *Citrullus colocynthis*, обладающих устойчивостью к CGMMV (NCIMB 42624), растений F1, полученных в результате скрещивания NCIMB 42624 x *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris* и привитых растений (NCIMB 42624 – Ercole и NCIMB 42624 – Sugar Baby) после инфицирования CGMMV путем механической

инокуляции листьев или путем прививания незараженного прививочного черенка к зараженному подвою. В качестве положительного контроля использовали растения из коммерческого сорта Sugar Baby, восприимчивого к CGMMV. +/- означает очень слабый сигнал, - означает отсутствие сигнала, + означает сильный положительный сигнал; dpi: дни после инфицирования. (*) – метод дот-блоттинга, (**) – метод ОТ-ПЦР.

Для контрольных растений, восприимчивых к CGMMV вирус был обнаружен в ходе всего развития растений от ранней (dpi 14) до поздней стадии (dpi 90). На ранних стадиях (dpi 14 и 30) были обнаружены очень слабые сигналы РНК CGMMV в NCIMB42624, однако, эти сигналы исчезли на более поздних стадиях (начиная с dpi 40 и позже). Аналогичный результат был получен для растений F1 (NCIMB 42624 x элитные линии). У привитых растений РНК CGMMV не обнаруживалась в листьях на любой стадии развития (от dpi 14 до dpi 90) за исключением того, что слабый сигнал был обнаружен для привитого растения NCIMB 42624 – «Sugar baby» через dpi 60. Как видно из Таблицы 4 ниже, дальнейший анализ привитых растений NCIMB 42624 – Sugar Baby показал, что лишь в одном растении из восьми на ранней стадии (dpi 14) было обнаружено наличие слабого сигнала, указывающего на присутствие малых количеств РНК CGMMV. На более поздней стадии (dpi 60) сигнал в том же растении более не определялся ни дот-блоттингом, ни ПЦР.

Таблица 4:

Привитое растение (NCIMB 42624 – «Sugar Baby»)			
	Дот-блоттинг 14 dpi	Дот-блоттинг 60 dpi	ПЦР 60 dpi
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	Не испытано
6	-/+	-	Не испытано
7	-	-	Не испытано
8	-	-	Не испытано

В приведенной выше Таблице 4 показаны результаты обнаружения РНК CGMMV в привитых растениях (NCIMB 42624 – Sugar Baby) после прививки к подвою, инфицированному CGMMV. +/- указывает на слабый сигнал, - указывает на отсутствие сигнала.

Результаты, приведенные в Таблицах 3 и 4 выше, не относящиеся к количественной, а лишь к качественной оценке, соответствуют более ранним количественным результатам, представленным в Таблице 2, в том смысле, что очень низкий уровень вируса на ранних стадиях растений, обладающих устойчивостью, на более поздних стадиях постепенно снижается и в этом случае обнаруживается только количественными методами, то есть обнаруживаются лишь крайне низкие титры вируса через 40 dpi или 60 dpi или позже. Кроме того, с помощью этих качественных методов вирус CGMMV в обладающих устойчивостью прививочных черенках обнаружить не удалось.

Кроме того, ОТ-кПЦР также проводили для листьев, полученных от комбинаций прививочного черенка и подвоя, когда подвой был заражен CGMMV в соответствии с описанием в разделе «Общие методы», пункт 6. Использовался подвой сорта Sugar Baby.

Для образцов листьев были получены следующие средние значения Ct, 140-150 dpi: Каждый параллельный опыт включает 6 растений. Обратите внимание, что низкое значение Ct означает высокий титр вируса, а высокое значение Ct означает небольшое количество вируса.

Таблица 5

Растение	Среднее значение Ct, 140-150 dpi	Симптомы
Лист, сорт Sugar Baby, без CGMMV (имитационная инокуляция)	26.22	Симптомы отсутствуют
Лист, сорт Sugar Baby, инфицированный CGMVV (параллельный опыт 1)	9.15	Сильные симптомы (1 балл)
Лист, сорт Sugar Baby, инфицированный CGMVV (параллельный опыт 2)	8.92	Сильные симптомы (1 балл)

Лист прививочного черенка привитого растения: NCIMB42624 – Sugar Baby (параллельный опыт 1)	27.36	Симптомы отсутствуют (4 балла)
Лист прививочного черенка привитого растения: NCIMB42624 – Sugar Baby (параллельный опыт 2)	26.49	Симптомы отсутствуют (4 балла)

Вышесказанное ясно демонстрирует, что какие-либо симптомы заражения CGMMV не наблюдались у растений NCIMB 42624 и растений, полученных в результате скрещивания NCIMB 42624 и элитных линий *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*, и в верхних листьях таких растений содержались очень низкие уровни вируса, практически ниже предела обнаружения; и какие-либо симптомы заражения CGMMV не наблюдались на прививочном черенке привитых растений, содержащих прививочный черенок NCIMB42624, привитый на зараженный CGMMV подвой (“NCIMB42624 – Sugar Baby” и “NCIMB42624 – Ercole”). Таким образом, растения NCIMB 42624 обладают устойчивостью к CGMMV, устойчивость к CGMMV передается другим видам *Citrullus*, включая элитные линии *Citrullus lanatus* подвид *vulgaris*, и устойчивость сохраняется, когда прививочные черенки, обладающие устойчивостью к CGMMV, прививаются на подвои, зараженные CGMMV.

Результаты, пункт 3 – картирование QTL устойчивости к CGMMV в NCIMB 42624 и развитие маркеров

Были получены три картирующих популяции путем скрещивания NCIMB 42624 с элитной линией арбуза, восприимчивой к CGMMV. Была получена одна популяция BC1 (обратное скрещивание) и две популяции F2. Растения механически инокулировали CGMMV в соответствии с описанием, и осуществлялась оценка симптомов с использованием описанной шкалы визуальной оценки, а также с использованием метода ИФА для определения титров вируса. Картирование осуществляли в основном с использованием симптомов на основании оценки через 30 dpi или позже.

Всего картирование производили для семи QTL (два на хромосоме 1, один на хромосоме 4, два на хромосоме 5 и один на хромосоме 7 и один на хромосоме 9), из которых 5 QTL (QTL.1.1 на хромосоме 1, QTL4.1 на хромосоме 4, QTL5.2 на хромосоме 5, QTL7.1 на хромосоме 7 и QTL9.1 на хромосоме 9, см. Таблицу 6 ниже, использовали для дальнейшего обратного скрещивания, для этих пяти QTL ниже приведены маркеры SNP, связанные с этими QTL.

Два QTL, QTL7.1 и QTL9.1, были доминантными, их наличие привело к получению растений со степенью выраженности симптомов, составляющей 3 или 4 балла. Также они существенно влияли на титр вируса, который был значительно снижен в культурных арбузах, в которые эти QTL были интрогрессированы путем обратного скрещивания.

В Таблице ниже (Таблица 6) указана хромосома каждого из пяти QTL, а также положение пары оснований (bp) SNP в геноме культурного арбуза (см. cucurbitgenomics.org, геном арбуза (Chareleston Gray)). Генотип SNP указан для родительского растения, обладающего устойчивостью (т.е. NCIMB 42624), и для восприимчивого родительского растения (элитная линия арбуза). Семена с номером доступа NCIMB 42625 являются гомозиготными по генотипу SNP и содержат все пять QTL в гомозиготной форме.

Таблица 6:

Хромосома культурного арбуза (Chr)	Нуклеотидное положение SNP в геноме арбуза (номер основания);	SNP маркер, наиболее тесно связанный с QTL (указывается наиболее тесно связанный маркер)	Генотип SNP восприимчивого родительского растения	Генотип SNP донора, обладающего устойчивостью к CGMMV
Chr1 (QTL1.1)	6,555,391	SNP1 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO: 1	TT	CC
Chr1 (QTL1.1)	16,631,610	SNP2 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO: 2	AA	GG
Chr1 (QTL1.1)	26,238,488	SNP3 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:3	TT	CC

Chr1 (QTL1.1)	34,609,471	SNP4 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:4	TT	CC
Chr1 (QTL1.1)	35,238,267	SNP5 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:5 (наиболее тесно связанный)	AA	GG
Chr1 (QTL1.1)	35,766,439	SNP6 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:6	CC	TT
Chr4 (QTL4.1)	4,230,711	SNP7 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:7	AA	TT
Chr4 (QTL4.1)	24,321,690	SNP8 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:8 (наиболее тесно связанный)	AA	CC
Chr4 (QTL4.1)	25,526,846	SNP9 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:9	GG	AA
Chr5 (QTL5.2)	30,786,503	SNP10 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:10	CC	TT
Chr5 (QTL5.2)	32,788,817	SNP11 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:11 (наиболее тесно связанный)	GG	AA
Chr5 (QTL5.2)	36,842,501	SNP12 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:12	CC	TT
Chr7 (QTL7.1)	4,784,519	SNP13 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:13	GG	AA
Chr7 (QTL7.1)	7,848,633	SNP14 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:14 (наиболее тесно связанный)	GG	AA
Chr7 (QTL7.1)	8,334,624	SNP15 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:15	AA	GG
Chr7 (QTL7.1)	11,166,694	SNP16 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:16	TT	GG
Chr7 (QTL7.1)	18,775,728	SNP17 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:17	CC	TT
Chr7 (QTL7.1)	21,389,410	SNP18 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:18	GG	AA
Chr9 (QTL9.1)	31,394,464	SNP19 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:19	TT	CC

Chr9 (QTL9.1)	32,499,549	SNP20 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:20	CC	GG
Chr9 (QTL9.1)	34,607,108	SNP21 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:21	AA	GG
Chr9 (QTL9.1)	35,343,850	SNP22 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:22 (наиболее близко связанный)	TT	CC
Chr9 (QTL9.1)	36,923,004	SNP23 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:23	TT	CC
Chr9 (QTL9.1)	38,321,162	SNP24 относится к нуклеотиду 51 в SEQ ID NO:24	TT	GG

Последовательность для каждого SNP указана в перечне последовательностей и в настоящем документе, последовательность имеет тот же номер, что и SNP. Последовательность содержит нуклеотид SNP устойчивого донора. Таким образом, для SNP1 последовательность, содержащая SNP обладающего устойчивостью родительского растения (С в положении 51), представлена как SEQ ID NO: 1, и т.д. См. также Таблицу 1.

Также были получены линии BC3 и F2, содержащие различные комбинации QTL и единственный QTL. Будет проведена их оценка на их устойчивость к CGMMV и на содержание титров вируса после инокуляции.

Также будет проведена оценка титров вируса и то, происходит ли передача вируса восприимчивым растениям арбуза или другим хозяевам, таким как огурец, при крайне низких титрах вируса. Аналогичным образом, будет изучена возможность передачи вируса семенам устойчивых к CGMMV растений.

Кроме того, будет осуществляться точное картирование. Термин «точное отображение» относится к методам, с помощью которых можно более точно определить положение QTL. Например, может осуществляться анализ большой популяции, отобранной по определенному признаку, на предмет сегрегации признака, и можно выбрать маркеры SNP и растения, содержащие рекомбинационные события в области между маркерами, чтобы определить, между какой парой маркеров SNP расположен QTL. Также, чтобы сузить интервал, в котором находится QTL, можно искать дополнительные маркеры, расположенные возле наиболее связанного маркера или рядом с наиболее связанным маркером.

Примеры: Передача вируса от растений NCIMB42624 (образец *C. colocynthis*) огурцам и восприимчивым растениям арбуза

Для получения инокулята использовали листья растения NCIMB42624, которое было механически инокулировано вирусом CGMMV европейского типа VE459 (в соответствии с описанием выше), но которое не имело симптомов (4 балла), и инокулят использовался для механической инокуляции 215 растений огурца сорта Sheila и 193 растений арбуза сорта Sugar Baby. Примерно через 30 dpi растения осуществлялась визуальная оценка растений на наличие симптомов CGMMV, а также осуществляли ПЦР-анализ для выявления вируса в листьях.

Результаты представлены ниже в Таблице 7:

Огурец сорта Sheila			
Количество растений с симптомами	Количество растений без симптомов	Количество растений у которых был обнаружен CGMMV с помощью ПЦР	% растений, зараженных вирусом
1	214	1	0.46%
Арбуз, сорт Sugar Baby			
0	193	0	0.00%

Результаты показали, что лишь одно растение огурца было инфицировано инокулятом (симптомы наблюдались лишь у одного растения и тест ПЦР был положительным лишь для одного растения), при этом ни одно растение арбуза не было инфицировано инокулятом. Это означает, что передача CGMMV растениям арбуза от устойчивого образца *C. colocynthis*, номер доступа NCIMB 42624 не происходит, а передача вируса растениям огурца происходит лишь на очень низком уровне (заражается менее 1% растений).

Примеры: Передача CGMMV семенам линий арбуза, содержащих различные комбинации QTL из растения-донора *C. colocynthis* (NCIMB 42624)

У различных семейств F3, которые содержали один или несколько QTL из растения-донора *C. colocynthis* и которые выжили после механической инокуляции CGMMV, были получены плоды, и осуществляли анализ семян из таких плодов на

наличие вируса CGMMV с использованием количественной ПЦР (ОТ-кПЦР) в соответствии с описанием выше. Цель состояла в том, чтобы определить, могут ли QTL предотвратить заражение семян и, таким образом, передачу вирусом семян. кПЦР проводилась через 210 dpi. Низкое значение Ct указывает на высокий титр вируса, а высокое значение Ct (более 30) указывает на низкий титр вируса.

Результаты представлены в Таблице 8:

Линия	Симптомы плодов	кПЦР на семенах плодов: значение Ct	Разъяснение инфицирования семян вируса
X16_4305-15	NO	37.09	Отриц.
X16_4310-17	NO	36.93	Отриц.
X16_4311-11	NO	34.08	Отриц.
X16_4311-8	NO	35.46	Отриц.
Sugar baby Mock	NO	nd	Отриц.
X16_4306-1	NO	33.70	Отриц.
X16_4310-9	NO	34.28	Отриц.
X16_4310-35	NO	35.49	Отриц.
X16_4310-8	NO	36.00	Отриц.
X16_4307-24	NO	38.01	Отриц.
X16_4311-6	NO	32.50	Отриц.
X16_4305-20	NO	32.25	Отриц.
X16_4312-4	NO	38.66	Отриц.
X16_4312-2	NO	22.86	Полож.
X16_4307-22	NO	22.99	Полож.
X16_4312-6	NO	32.40	Отриц.
X16_4311-3	NO	32.85	Отриц.
X16_4305-8	NO	34.55	Отриц.
X16_4305-17	NO	18.56	Полож.
X16_4310-15	NO	25.22	Полож.
X16_4312-16	NO	24.98	Полож.
X16_4307-9	NO	24.45	Полож.
X16_4312-10	NO	19.28	Полож.
X16_4311-1	NO	17.44	Полож.
Sugar baby	YES	19.70	Полож.

X16_4305-10	NO	20.16	Полож.
X16_4307-12	NO	17.46	Полож.

Результаты показали, что для всех линий, которые содержали, по меньшей мере, QTL 9.1 и/или QTL 7.1, передача вируса CGMMV семенам отсутствовала. В частности, представляется, что присутствие, по меньшей мере, QTL9.1 предотвращало передачу вируса семенам.

ПРИМЕРЫ: Сравнение образцов *C. colocynthis* на устойчивость к CGMMV

Были пророщены десять семян различных образцов *C. colocynthis*, осуществлялась механическая инокуляция растений в соответствии с описанием выше для сравнения их устойчивости к CGMMV с устойчивостью образца с номером доступа NCIMB 42624. Определяли фенотип каждого растения с использованием следующей шкалы: 1 балл (сильные симптомы), 2 балла (умеренные симптомы), 3 балла (слабо выраженные симптомы) и 4 балла (отсутствие симптомов). Следует отметить, что известно, что образцы PI являются гетерогенными.

Многие образцы PI не проросли, поэтому их оценка не проводилась.

Могла осуществляться оценка следующих образцов PI: PI537300, PI542616, PI549161, GRIF14201, PI220778, PI386015, PI432337, PI388770 и PI386018. Из них три образца (PI537300, PI386015, PI388770) входили в основную коллекцию Министерства сельского хозяйства США, было описано, что потенциально они обладают устойчивостью к CGMMV (CucCAP, Second Annual CucCAP Team Meeting, March 27-28 2017, Chareleston, стр. 26 и 27, «Оценка коллекции PI арбуза на устойчивость к вирусу зеленой крапчатой мозаики огурца (CGMMM) и проведение ассоциативного картирования по всему геному для выявления SNP, связанных с устойчивостью к CGMMV», в комбинации с образцами *C. colocynthis* accessions основной коллекции Министерства сельского хозяйства США, указанными в коллекции GRIN, при этом лишь 4 образца *C. colocynthis* являются частью «основной субпопуляции»; три из 4 основных субпопуляций были включены в этот тест, однако, к сожалению, PI525082 не мог быть включен в тест).

Тем не менее, в нашем тесте средняя степень выраженности симптомов у всех протестированных образцов, включая три образца основной коллекции

Министерства сельского хозяйства США, составляла 3 балла или менее (среднее значение для отдельных растений), при этом ни одно растение в ходе всего опыта не получило 4 балла (отсутствие симптомов), за исключением растения NCIMB 42624 по изобретению (степень выраженности симптомов у всех растений составила 4 балла). Из всех других образцов *C. colocynthis* PI386015 обладал наиболее высокой устойчивостью к CGMMV, причем степень выраженности симптомов у всех растений составляла 3 балла (слабо выраженные симптомы). У образца PI537300 было 6 растений, степень выраженности симптомов у которых составляла 3 балла (слабо выраженные симптомы), и 4 растения, степень выраженности симптомов у которых составляла 2 балла (умеренные симптомы). У образца PI388770 было 6 растений, степень выраженности симптомов у которых составляла 1 балл (сильные симптомы), три растения, степень выраженности симптомов у которых составляла 2 балла (умеренные симптомы), и одно растение, степень выраженности симптомов у которого составляла 3 балла (слабо выраженные симптомы).

Тест подтвердил, что устойчивость к CGMMV у отобранных растений *C. colocynthis*, номер доступа NCIMB42624, имеется более высокий уровень устойчивости, чем у любых других протестированных образцов *C. colocynthis*, большинство из которых обладают устойчивостью не выше 3 баллов (слабо выраженные симптомы).

Формула изобретения

1. Культурное растение или клетка растения арбуза, содержащие фрагмент интрогрессии на хромосоме 9 и/или хромосоме 7 растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, вида *Citrullus colocynthis*, **отличающиеся тем**, что фрагмент интрогрессии на хромосоме 9 содержит последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, между SNP19 в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 19 и SNP24 в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 24, и при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 7 содержит последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, между SNP13 в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 13 и SNP18 в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 18.

2. Культурное растение или клетка растения арбуза по п. 1, **отличающиеся тем**, что фрагмент интрогрессии на хромосоме 7 содержит последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, для SNP14 (нуклеотид 51 в SEQ ID NO: 14), и при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 9 содержит последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, для SNP22 (нуклеотид 51 SEQ ID NO: 22).

3. Культурное растение или клетка растения арбуза, содержащие фрагмент интрогрессии из хромосомы 7 и/или на хромосоме 9 растения-донора, обладающего устойчивостью к CGMMV, вида *Citrullus colocynthis*, **отличающиеся тем**, что фрагмент интрогрессии на хромосоме 7 содержит аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 13 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13, и/или аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 14 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 15 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 15, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 16 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 16, и/или тимин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 17 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 17, и/или аденин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 18 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95%

идентичности последовательности с SEQ ID NO: 18; и при этом фрагмент интрогрессии на хромосоме 9 содержит цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 19 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 20 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 21 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21, и/или цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 22 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 22, или цитозин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 23 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 23, и/или гуанин в нуклеотиде 51 SEQ ID NO: 24 или последовательности, содержащей, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24.

4. Культурное растение или клетка растения арбуза по любому из предшествующих пунктов, **отличающиеся тем**, что фрагмент интрогрессии на хромосоме 7 присутствует в гомозиготной или в гетерозиготной форме, и/или фрагмент интрогрессии на хромосоме 9 присутствует в гомозиготной или гетерозиготной форме.

5. Культурное растение или клетка растения арбуза по любому из предшествующих пунктов, **отличающиеся тем**, что фрагмент интрогрессии получен из образца *Citrullus colocynthis*, репрезентативный образец семян которого внесен в базу под номером доступа NCIMB 42624.

6. Культурное растение или клетка растения арбуза по любому из предшествующих пунктов, **отличающиеся тем**, что указанное растение обладает устойчивостью к CGMMV, составляющей 3 балла (слабо выраженные симптомы) или 4 балла (отсутствие симптомов).

7. Культурное растение или клетка растения арбуза по любому из предшествующих пунктов, **отличающиеся тем**, что растение или клетка растения являются инбредным растением или инбредной клеткой растения, или гибридным растением F1 или клеткой растения F1, или диплоидным или тетраплоидным, или триплоидным растением или клеткой растения.

8. Семя, из которого произрастает растение по любому из пп. 1 - 7.
9. Плод или часть плода культурного растения арбуза, содержащие клетки растения по любому из пп. 1 - 7.
10. Материал для размножения культурного растения арбуза, содержащий клетки культурного растения арбуза по любому из пп. 1 - 7.
11. Применение диплоидной и тетраплоидной линии по п. 7 в качестве родительского растения для получения триплоидного гибридного семени.
12. Способ получения триплоидных гибридных семян культурного арбуза, включающий следующие этапы:
 - а) получение первого инбредного диплоидного растения арбуза, обладающего устойчивостью к CGMMV, содержащего две хромосомы 7, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 7 устойчивого к CGMMV растения-донора вида *Citrullus colocynthis*, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL7.1 и последовательность растения-донора для SNP14 (SEQ ID NO: 14), или между SNP13 и SNP18, или между SNP13 и SNP15; или фрагмент интрогрессии содержит QTL7.1 и генотип обладающего устойчивостью растения-донора для одного или нескольких или всех из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18;
 - б) получение второго инбредного тетраплоидного растения арбуза, обладающего устойчивостью к CGMMV, содержащего четыре хромосомы 7, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 7 устойчивого к CGMMV растения-донора вида *Citrullus colocynthis*, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL7.1 и последовательность растения-донора для SNP14 (SEQ ID NO: 14), или между SNP13 и SNP18, или между SNP13 и SNP15; или фрагмент интрогрессии содержит QTL7.1 и генотип обладающего устойчивостью растения-донора для одного или нескольких или всех из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18;

- c) опыление тетраплоидного растения арбуза, полученного на этапе b), с использованием пыльцы диплоидного растения арбуза, полученного на этапе a); и
- d) сбор семян из плодов, полученных на этапе c).

13. Способ получения триплоидных гибридных семян культурного арбуза, включающий следующие этапы:

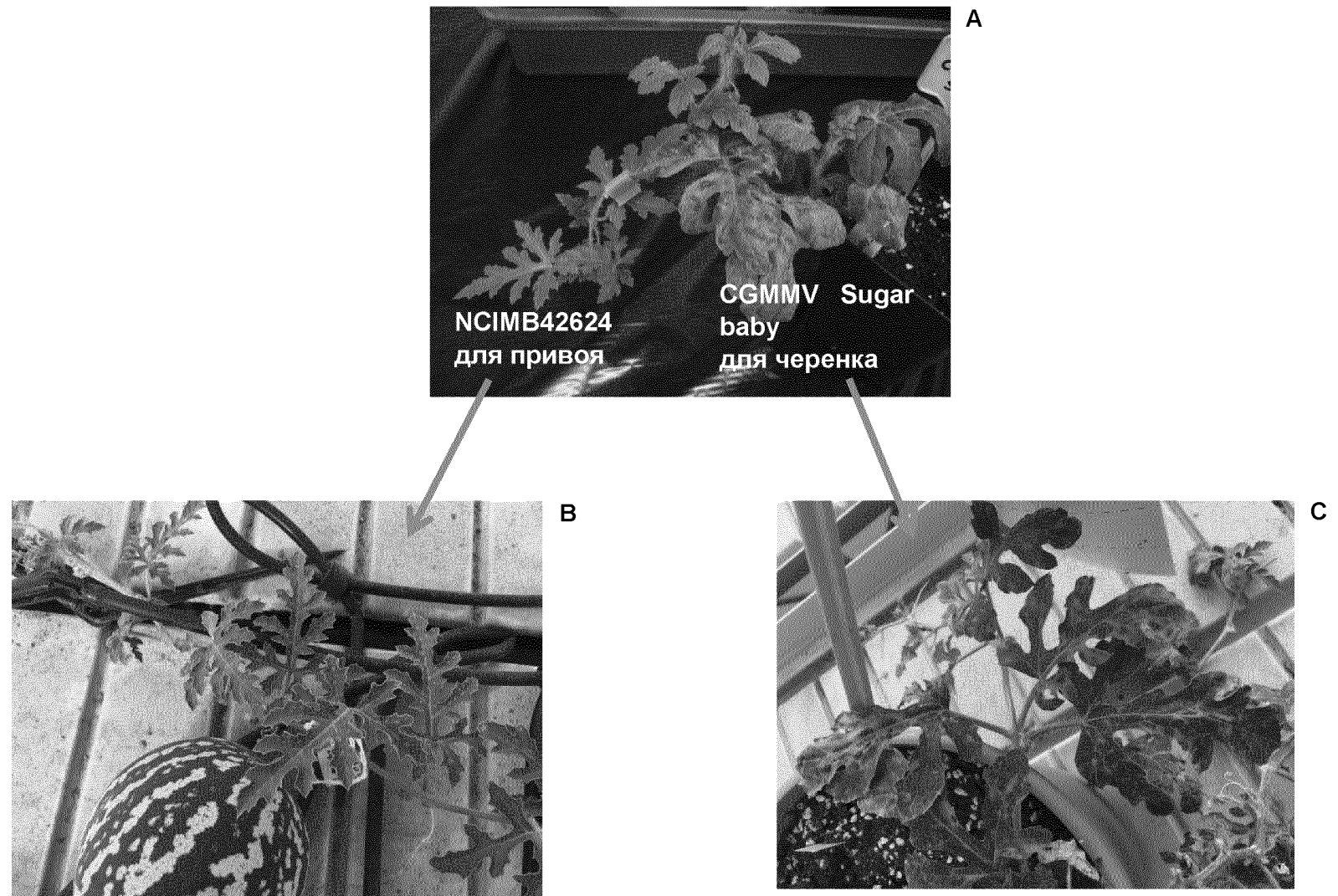
- a) получение первого инбредного диплоидного растения арбуза, обладающего устойчивостью к CGMMV, содержащего две хромосомы 9, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 9 устойчивого к CGMMV растения-донора вида *Citrullus colocynthis*, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL9.1 и последовательность растения-донора для SNP22 (SEQ ID NO: 22), или между SNP19 и SNP24, или между SNP21 и SNP123; или фрагмент интрогрессии содержит QTL9.1 и генотип обладающего устойчивостью растения-донора для одного или нескольких или всех из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24;
- b) получение второго инбредного тетраплоидного растения арбуза, обладающего устойчивостью к CGMMV, содержащего четыре хромосомы 9, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 9 устойчивого к CGMMV растения-донора вида *Citrullus colocynthis*, при этом фрагмент интрогрессии содержит QTL9.1 и последовательность растения-донора для SNP22 (SEQ ID NO: 22), или между SNP19 и SNP24, или между SNP21 и SNP23; или фрагмент интрогрессии содержит QTL9.1 и генотип обладающего устойчивостью растения-донора для одного или нескольких или всех из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24;
- c) опыление тетраплоидного растения арбуза, полученного на этапе b), с использованием пыльцы диплоидного растения арбуза, полученного на этапе a); и
- d) сбор семян из плодов, полученных на этапе c).

14. Применение одного или нескольких маркеров SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18 и/или одного или нескольких маркеров SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24 для идентификации растения или части растения, или клетки растения арбуза, обладающих устойчивостью к CGMMV.

15. Применение одного или нескольких маркеров SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18 и/или одного или нескольких маркеров SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24 для интрогрессии характеристики устойчивости к CGMMV в культурное растение арбуза, восприимчивое к CGMMV.

16. Способ скрининга растений или частей растения, или полученных из них ДНК на наличие фрагмента на хромосоме 7 и/или 9, придающего устойчивость к CGMMV, включающий следующие этапы:

- a) скрининг геномной ДНК на генотип SNP одного или нескольких или всех маркеров из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18 и/или для одного или нескольких из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24;
- b) и, при необходимости, отбор растений или частей растений, которые содержат устойчивый донорский генотип для одного или нескольких или всех из SNP13, SNP14, SNP15, SNP16, SNP17 и SNP18 и/или для одного или нескольких или всех из SNP19, SNP20, SNP21, SNP22, SNP23 и SNP24.



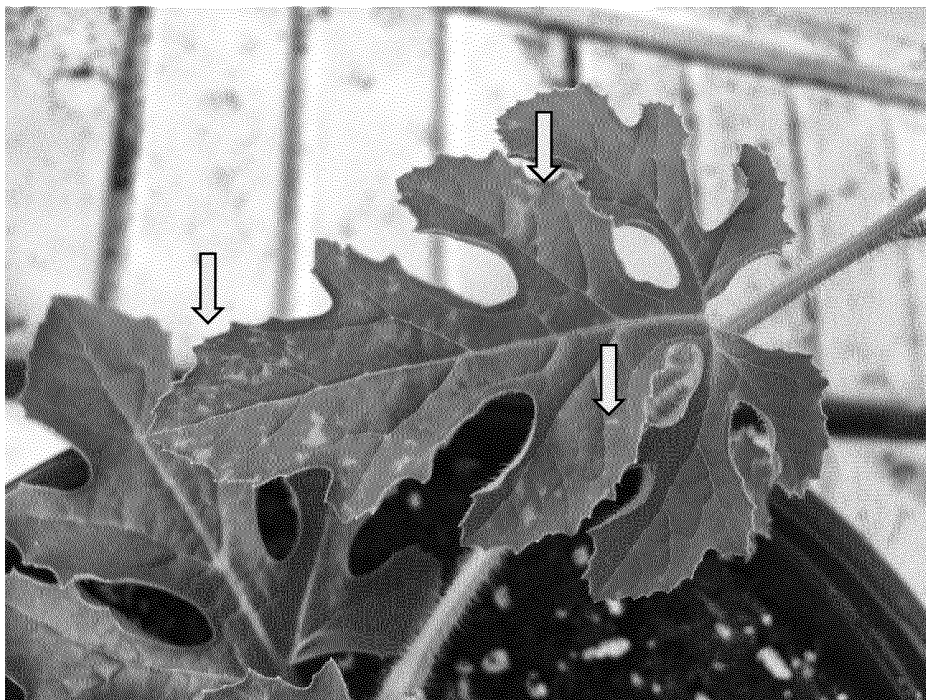
Фиг. 1



Фиг. 2



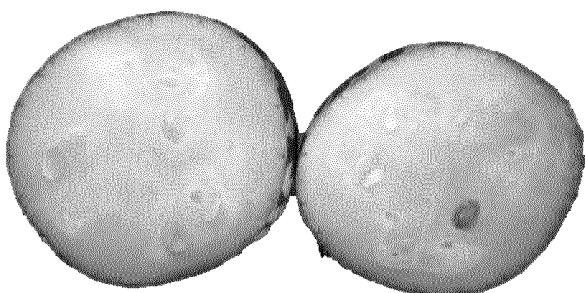
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6