

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041455**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.10.26**

**(21)** Номер заявки  
**201990273**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.07.07**

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

---

**(54) РАСТЕНИЯ ДЫНИ, УСТОЙЧИВЫЕ К ВИРУСУ ToLCNDV**

---

**(31)** **16179134.8; 62/500,941**

**(32)** **2016.07.12; 2017.05.03**

**(33)** **EP; US**

**(43)** **2019.07.31**

**(86)** **PCT/EP2017/067078**

**(87)** **WO 2018/011075 2018.01.18**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**НУНХЕМС Б.В. (NL)**

**(72)** Изобретатель:  
**Лизарзабуру Чавес Хуан Антонио (ES), Сконецка Джеффри (US), Белон Донья Даниель (ES)**

**(74)** Представитель:  
**Беляева Е.Н. (BY)**

**(56)** CARMELO LÓPEZ ET AL.: "Mechanical transmission of Tomato leaf curl New Delhi virus to cucurbit germplasm: selection of tolerance sources in Cucumis melo", EUPHYTICA, vol. 204, № 3, 28 January 2015 (2015-01-28), pages 679-691, XP055257361, NL, ISSN: 0014-2336, DOI: 10.1007/s10681-015-1371-x, page 687, left-hand column, paragraph 2, page 689, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 1

S. YAZDANI-KHAMENEH ET AL.: "Report of a new begomovirus on melon in Iran", NEW DISEASE REPORTS, vol. 28, 19 December 2013 (2013-12-19), page 17, XP055258594, DOI: 10.5197/j.2044-0588.2013.028.017, the whole document

Eppo Reporting Service: "EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION", 1 June 2015 (2015-06-01), pages 1-21, XP055257700, Paris, retrieved from the Internet: URL: <http://archives.eppo.int/EPPORreporting/2015/Rse-1506.pdf> [retrieved on 2016-03-11], page 8, last paragraph - page 9, last paragraph

WO-A1-2010123904

WO-A1-2014090968

FAUQUET C.M. ET AL.: "Geminivirus strain demarcation and nomenclature", ARCHIVES OF VIROLOGY; OFFICIAL JOURNAL OF THE VIROLOGY DIVISION OF THE INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES, SPRINGER-VERLAG, VI, vol. 153, № 4, 7 February 2008 (2008-02-07), pages 783-821, XP019592535, ISSN: 1432-8798

WO-A1-2017114848

---

**(57)** Настоящая заявка относится к растениям дыни (*Cucumis melo*), обладающим устойчивостью к заражению вирусом курчавости листьев томата Нью-Дели (*ToLCNDV*). Устойчивые растения дыни содержат геномный фрагмент интрогрессии на хромосоме 5, который придает доминантную устойчивость к *ToLCNDV*. Также раскрыты маркеры для идентификации указанных фрагментов, способы идентификации или получения устойчивых растений дыни.

---

**B1**

**041455**

**041455 B1**

Настоящая заявка относится к растениям дыни (*Cucumis melo*), обладающим устойчивостью к заражению вирусом курчавости листьев томата Нью-Дели (ToLCNDV). Устойчивые растения дыни содержат геномный фрагмент интрогрессии на хромосоме 5, который придает доминантную устойчивость к ToLCNDV. Также описаны маркеры для идентификации этих фрагментов, способы идентификации и получения растений дыни, обладающих устойчивостью к этому вирусу.

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

Изначально, в 1995 г. в Индии было обнаружено, что ToLCNDV инфицирует растения томата (*Solanum lycopersicum*). Затем было обнаружено, что ToLCNDV также инфицирует растения других растений рода *Solanaceae*, таких как *Solanum melongena* (баклажан), перец чили (род *Capsicum*) и *Solanum tuberosum* (картофель). В 2012 г. в Испании были обнаружены инфицированные ToLCNDV растения бахчевых культур (кабачок, *Cucurbita pepo* сорт *gromontiiina*), а в 2015 г. вирус был идентифицирован как источник заболевания в растениях дыни, огурца и кабачка в Тунисе. В то же время было доказано, что вирус инфицирует много растений рода *Cucurbitaceae*, такие как *Benincasa hispida* (тыква восковая), *Citrullus lanatus* (арбуз), *Cucumis melo* (дыня), *Cucumis melo*, сорт *flexuosus* (дыня змеевидная), *Cucumis sativus* (огурец), *Cucurbita moschata* (тыква мускатная), *Cucurbita pepo* (тыква обыкновенная), *Cucurbita pepo*, сорт *gromontiiina* (кабачок), *Lagenaria siceraria* (горлянка обыкновенная), *Luffa cylindrica* (тыква мочалочная), *Momordica charantia* (тыква китайская горькая). Также были описаны случаи заражения сорных растений (например, *Eclipta prostrata* - семейство *Asteraceae*) и других культурных растений, таких как *Hibiscus cannabinus* (кенаф - семейство *Malvaceae*) и *Carica papaya* (папайя - семейство *Caricaceae*). В Средиземноморском регионе заболевание встречается у различных видов сельскохозяйственных культур в Италии (Сицилия), Испании и Тунисе. В азиатских странах инфекция была обнаружена в различных культурах в Бангладеш, Индии, Индонезии, Пакистане, Филиппинах, Шри-Ланке, Тайване и Таиланде. Дополнительная информация о географическом распространении ToLCNDV отсутствует, однако, исходя из текущих наблюдений очевидно, что вирус далее распространяется и географически, и среди других культур. Симптомы заболевания в целом включают фенотипическое появление желтой мозаики на листьях, скручивание листьев, набухание жилок и низкорослость растений. У бахчевых культур при заражении молодых растений ToLCNDV проявляется замедленный рост и уменьшение или снижение количества плодов. Также сообщалось о плодах с шероховатостью кожуры и продольным растрескиванием. Таким образом, ToLCNDV является причиной экономически значимых потерь урожая различных важных видов сельскохозяйственных культур и представляет собой серьезную угрозу. Заражение растений ToLCNDV происходит постоянно при передаче вируса белокрылкой (*Bemisia tabaci*), питающаяся флорой (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO RS 2015/114, 2016/024, 2016/040, дата внесения записи: 2015-06).

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

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

Были разработаны методы передачи ToLCNDV путем механического переноса сока зараженного растения цуккини неинфицированным растениям из других родов тыквенных растений (*Cucumis*, *Cucurbita*, *Citrullus*, *Lagenaria*). Были идентифицированы пять образцов *Cucumis melo* (подвид *agrestis*, сорт *momordica*: Mom-KhaInd/ Kharbuja, Mom-PI124Ind/ PI 124112, Mom-PI124Ind/ PI 414723 и подвид *agrestis* дикого типа: Ag-WM9Ind/WM9, Ag-WM7Ind/WM7), обладающих устойчивостью к ToLCNDV (Lopez et al., 2015, *Euphytica*, 204(3), 679-691). Подтверждение устойчивости этих образцов к природному заражению белокрылкой не проводили.

В работе Saez et al., 2016, с. 214-216 (*Proceedings of Cucurbitaceae*, 2016, XI Заседание EUCARPIA (Европейской ассоциации научных исследований по растениеводству) по Генетике и Размножению *Cucurbitaceae*, 24-28 июля 2016 г., Варшава, Польша) описано, что отношение устойчивых неустойчивых растений в популяции F2, полученной из образца WM-7 *C. melo* подвид *agrestis*, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, составляет 3:1, что указывает на наличие единственного доминантного гена устойчивости, присутствующего в WM-7. Как и в работе Lopez et al., 2015, выше, использовали механическую инокуляцию, а не природный путь инфицирования через белокрылку.

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

являются ли образцы, идентифицированные как устойчивые к инфекции ToLCNDV, устойчивыми в природных условиях выращивания, когда вирус переносится белокрылками.

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

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

Целью настоящего изобретения является предоставление мер контроля инфекции ToLCNDV у растений дыни.

В соответствии с настоящим изобретением описаны растения и клетки растений дыни, устойчивые к инфекциям, вызываемым ToLCNDV.

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

Авторы изобретения идентифицировали донорский образец дыни, обладающий устойчивостью к ToLCNDV, и произвели картирование устойчивости в сегрегирующей популяции, путем инфицирования белокрылкой испанским штаммом ToLCNDV для фенотипирования устойчивости. Локус количественного признака (QTL) был идентифицирован на хромосоме 5 (QTL5) и интрогрессирован от дикого донорского образца в элитную культурную линию дыни. Семена элитной линии, включающие интрогрессию QTL5 в гомозиготной форме, были внесены в базу Nunhems B.V. под номером доступа NCIMB 42585 в соответствии с Будапештским договором. В этих семенах присутствует донорский генотип маркеров однонуклеотидного полиморфизма (SNP) (SNP\_01-SNP\_06), предоставляемый в соответствии с настоящим изобретением. Сам донор не однороден и имеет белую мякоть плода с низким содержанием сухих веществ. Этот образец не имеет агрономической ценности. Донор также уже отсутствует в американском семенном фонде. Путем идентификации и переноса QTL5 от донора в культурную дыню стало возможным получать культурные сорта дыни и сорта с высокой агрономической ценностью (с единообразными характеристиками и с плодами, обладающими нормальным рыночным качеством, имеющими высокое содержание сухих веществ и высокую лежкоспособность), с устойчивостью к ToLCNDV; таким образом, можно выращивать эти сорта дыни в районах, зараженных ToLCNDV без потери урожая.

В контексте настоящего изобретения термины "клетки растений дыни" или "растения дыни", которые также могут именоваться в данной области "клетки растений мускусной дыни" или "растения мускусной дыни" означают клетки, полученные из растений вида *Cucumis melo*, или растения, принадлежащие к виду *Cucumis melo*.

Вид *Cucumis melo* может подразделяться на следующие подвиды: *C. melo cantalupensis*, *C. melo inodorous* и *C. melo reticulatus*. *C. melo cantalupensis* также называют канталупой, в основном она имеет круглую форму с выступающими ребрами и почти без сетчатости. Большинство плодов имеют сладкую мякоть оранжевого цвета, как правило, плоды имеют сильный, душистый запах. В отличие от европейской канталупы североамериканская канталупа не относится к этому типу, однако она принадлежит к настоящим мускусным дыням. *C. melo inodorous* (или зимние дыни) подразделяются на различные типы, такие как белая мускатная дыня, Пьель де сапо, сахарная дыня, японская дыня и т.д. *C. melo reticulatus* - настоящая мускусная дыня с кожурой, покрытой сетчатым узором (сетчатая кожа), этот подвид включает дыни Галия, дыни Шарлин и североамериканскую канталупу.

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

В контексте настоящего изобретения термины "устойчивый" или "обладающий устойчивостью" относятся к растению, которое является видом-хозяином определенного патогена и, следовательно, может быть заражено данным патогеном, однако при этом растение содержит генетический элемент (например,

фрагмент интрогрессии), приводящий к снижению развития и/или распространения патогена в растении после заражения по сравнению с растением, восприимчивым к такому патогену, в котором такой генетический элемент отсутствует. В контексте настоящего изобретения термины "устойчивый" или "обладающий устойчивостью", в частности, относятся к растениям или клеткам растений, устойчивым к ToLCNDV. Устойчивость - это относительный термин, который может охватывать целый ряд (различных) реакций, вызванных патогенной инфекцией, в растении или клетке растения. Эффект этих реакций в растении или клетке растения может быть измерен различными способами. Как правило, эффект измеряется путем определения уровня симптомов, проявляющихся в растении или клетке растения. Как правило, среднюю степень выраженности симптомов в нескольких растениях в линии (например, в 10 растениях и более) сравнивают со средней степенью выраженности симптомов в растениях контрольной линии или сорта, предпочтительно в растениях контрольной линии или сорта, восприимчивых к такому патогену. Таким образом, в определенный момент времени производится оценка и подсчет баллов по меньшей мере для 10 и более отдельных растений линии или сорта и вычисляется средний индекс активности заболевания.

В контексте настоящего изобретения в соответствии с фенотипическими наблюдениями, проведенными после инфицирования ToLCNDV, применяют следующие общеизвестные уровни выраженности симптомов.

1 = Мертвое растение.

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

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

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

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

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

7 = Незначительное свертывание, мозаичность и хлороз, снижение роста не наблюдается. Симптомы наблюдаются лишь в нижней части растения.

8 = Слабая мозаичность.

9 = Симптомы отсутствуют.

Для определения уровня выраженности симптомов (или индекса активности заболевания) предпочтительно молодые растения заражают ToLCNDV. Такими молодыми растениями предпочтительно являются растения возраста увеличения первого истинного листа, предпочтительно приблизительно возраста 12-15 дней после посева. Заражение предпочтительно осуществляют через переносчика вируса (*Bemisia*), который поедает растения. Для этого прорастивание и выращивание растений осуществляют в оптимальных условиях или в условиях близких к оптимальным. Уровень выраженности симптомов предпочтительно определяют по меньшей мере один раз, например, через 30 дней после инфицирования (или позже, например, через 31, 32, 33, 34, 35 дней после инфицирования). При необходимости для подтверждения результата уровень выраженности симптомов определяют дважды или даже трижды в разные моменты времени после заражения, например, первую оценку производят приблизительно через 15, 20 или 25 дней после заражения ToLCNDV, а вторую оценку - приблизительно через 30 дней после заражения (или позднее, например, через 31, 32, 33, 34, 35 дней после заражения). См. также раздел "Примеры". В соответствии с одним аспектом растительная линия именуется устойчивой к инфицированию ToLCNDV, если ее средний индекс активности заболевания 5,0 или выше, в то время как восприимчивая контрольная линия или сорт, например сорт Gandalf (или Gandalf F1, Nunhems B.V.) или Vedantrais имеет средний индекс активности заболевания 2,5 или менее или 2,0 или менее при выращивании в тех же условиях и инфицировании таким же образом.

Наблюдалось, что интрогрессия специфического фрагмента, расположенного на хромосоме 5 в диком растении-доноре дыни, в культурные растения дыни придает устойчивость к инфекции ToLCNDV культурным растениям дыни или полученным из них клеткам. Для придания устойчивости к ToLCNDV достаточно, чтобы соответствующий фрагмент присутствовал только в гетерозиготном состоянии, это показывает, что фрагмент придает доминантную устойчивость к инфекции ToLCNDV. Были идентифицированы единичные нуклеотидные полиморфизмы (SNP) на хромосоме 5, которые тесно связаны с фрагментом хромосомы 5, обеспечивающим устойчивость к ToLCNDV. В депонированных семенах нуклеотид SNP устойчивого донора (т.е. нуклеотид фрагмента интрогрессии) присутствует в гомозиготной форме, т.е. донорный нуклеотид присутствует в гомозиготной форме для SNP\_01-SNP\_06 (связан с QTL5). Следовательно, SNP можно использовать для тестирования присутствия фрагмента интрогрессии, содержащего QTL5, в клетке, ткани, части растения и/или в селекции с помощью маркера (СПМ) для переноса QTL в другие элитные линии или сорта дыни. SNP также можно использовать для селекции растений, содержащих меньшие фрагменты интрогрессии, по сравнению с фрагментами присутствующими

щими в депонированных семенах, при этом такие меньшие субфрагменты все равно содержат QTL. В качестве альтернативы SNP можно использовать для идентификации других доноров, которые включают QTL5, и для введения этих QTL в культурную дыню.

Таким образом, настоящее изобретение относится к растениям или клеткам растений дыни, содержащим фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора между SNP\_01 и SNP\_06, предпочтительно последовательность растения-донора между SNP\_01 и SNP\_05, более предпочтительно последовательность растения-донора между SNP\_01 и SNP\_04. QTL, придающий устойчивость к ToLCNDV, присутствует на фрагменте интрогрессии, что может быть определено с помощью анализа устойчивости в соответствии с описанием в настоящем документе.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения настоящее изобретение относится к культурным растениям или клеткам растений дыни, содержащим фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора между SNP\_02 и SNP\_06, предпочтительно последовательность растения-донора между SNP\_02 и SNP\_05, более предпочтительно последовательность растения-донора между SNP\_02 и SNP\_04.

Настоящее изобретение также относится к растениям или клеткам растений дыни, содержащим фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, между SNP\_03 и SNP\_06, предпочтительно последовательность растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, между SNP\_03 и SNP\_05.

Наиболее предпочтительно настоящее изобретение относится к растениям или клеткам растений дыни, содержащим фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, между SNP\_03 и SNP\_04.

В соответствии с одним аспектом выражение "фрагмент интрогрессии, содержащий последовательность между двумя SNP (однонуклеотидными полиморфизмами)" означает, что один или оба из двух SNP также происходят от донора, обладающего устойчивостью", т.е. имеют донорный нуклеотид в положении SNP. В соответствии с другим аспектом эти два SNP происходят от реципиента, например от растения дыни, не обладающего устойчивостью, и лишь участок между двумя SNP происходит из устойчивого донора и придает устойчивость к ToLCNDV, т.е. донорный фрагмент, придающий устойчивость расположен между двух маркеров SNP. Так, например, растение может содержать фрагмент интрогрессии, содержащий последовательность устойчивого к ToLCNDV растения-донора дыни между SNP\_03 и SNP\_04, в соответствии с одним аспектом это растение содержит тимин (Т) в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 и/или аденин (А) в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4, т.е. донорные нуклеотиды. В соответствии с другим аспектом лишь участок (весь участок или его часть) между этими двумя SNP происходит из донора, в то время как SNP\_03 и SNP\_04 происходят из реципиента, например, с цитозином (С) в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 и нуклеотид гуанином (G) в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4.

Таким образом, в отношении QTL на хромосоме 5 SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 и SNP\_06 все могут иметь генотип устойчивого донора. Или лишь SNP\_01 и SNP\_02 могут иметь генотип устойчивого донора; или только SNP\_02 и SNP\_03 могут иметь генотип устойчивого донора; или только SNP\_03 и SNP\_04 могут иметь генотип устойчивого донора и т.д. Или лишь один SNP, т.е. только SNP\_01, или только SNP\_02, или только SNP\_03, или только SNP\_04, или только SNP\_05, или только SNP\_06 имеет генотип устойчивого донора. Таким образом, SNP, которые не имеют генотип устойчивого донора, имеют другой генотип, генотип реципиента. Генотип реципиента для SNP может быть любым из 3 других нуклеотидов, т.е. для SNP\_01 генотип реципиента может быть аденином, гуанином или тимином. Таким образом, например, когда указано, что фрагмент интрогрессии расположен между SNP\_03 и SNP\_04 в отношении QTL на хромосоме 5, и SNP\_03, и SNP\_04 могут иметь генотип устойчивого донора. Или лишь один SNP, т.е. лишь SNP\_03, или лишь SNP\_04, могут иметь генотип устойчивого донора, или ни SNP\_03, ни SNP\_04 может не иметь генотип устойчивого донора, при этом последовательность между ними содержит QTL5.

Причина того, что не все SNP в соответствии с настоящим изобретением должны иметь генотип устойчивого донора, состоит в том, что фрагмент интрогрессии, содержащий QTL из донора, может быть меньше, чем фрагмент хромосомы, интрогрессированный, например, в депонированные семена, но это фрагмент все равно содержит QTL5. Тем не менее можно определить, что растение содержит фрагмент интрогрессии (содержащий QTL5) по фенотипу и/или путем переноса фрагмента в восприимчивое растение и, следовательно, переноса фенотипа устойчивости к ToLCNDV или путем секвенирования участка между SNP маркерами для идентификации донорного фрагмента или с помощью других способов, известных специалистам, таких как насыщение области большим количеством маркеров SNP, исследования на аллелизм, идентификация причинного гена и т.д.

Таким образом, для демонстрации того, что QTL5 присутствует в растении или клетке растения может быть использована комбинация методов, даже если не для всех связанных SNP присутствует до-

норный генотип SNP. Средний индекс устойчивости к ToLCNDV, который придается QTL5, составляет по меньшей мере 5.0 при переносе в линию или сорт, которые не обладают устойчивостью при условии, что этот признак является доминантным.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора между SNP\_01 и SNP\_06, между SNP\_01 и SNP\_05, между SNP\_01 и SNP\_04, между SNP\_02 и SNP\_06, между SNP\_02 и SNP\_05, между SNP\_02 и SNP\_04, между SNP\_03 и SNP\_06, между SNP\_03 и SNP\_05, предпочтительно между SNP\_03 и SNP\_04 придает устойчивость к ToLCNDV культурным растениям или клеткам растений дыни по настоящему изобретению.

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

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к культурным растениям (или частям растений) или клеткам растений дыни, содержащим фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV и фрагмент интрогрессии может быть идентифицирован по генотипу SNP растения-донора (содержит генотип SNP растения-донора) для одного или нескольких (или для всех) следующих SNP: SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 и/или SNP\_06 и при необходимости любой SNP между SNP\_01 и SNP\_06.

В соответствии с одним аспектом растение, часть растения или клетка растения содержат QTL5 и содержат донорский генотип SNP по меньшей мере для SNP\_03, так как этот SNP наиболее сильно связан с устойчивостью QTL5 к ToLCNDV. В соответствии с еще одним аспектом растение, часть растения или клетка растения содержат донорский генотип SNP по меньшей мере для SNP\_03 и SNP\_04 или по меньшей мере для SNP\_03 и SNP\_02. При необходимости растение, часть растения или клетка растения содержат QTL5 и содержат донорский генотип SNP по меньшей мере для SNP\_01, SNP\_02 и SNP\_03; или для SNP\_02, SNP\_03 и SNP\_04.

Следовательно, фрагмент интрогрессии может содержать донорный генотип SNP для всех маркеров SNP, связанных с QTL5 (как в семенах, депонированных в соответствии с настоящим изобретением), или фрагмент меньшего размера, в результате чего один или несколько маркеров SNP отсутствуют. Как описано ниже, могут отсутствовать все донорные маркеры SNP или все донорные маркеры SNP за исключением одного, при этом QTL5 будет все же присутствовать на фрагменте интрогрессии.

Нуклеотидные последовательности (SEQ ID NO: 1-6), содержащие SNP согласно настоящему изобретению, представляют собой нуклеотидные последовательности устойчивого донора, т.е. они содержат донорный нуклеотид SNP. Следовательно, в соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к культурным растениям (или частям растений) или клеткам растений дыни, содержащим фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, и фрагмент интрогрессии может быть идентифицирован по (содержит) SEQ ID NO: 1 или идентифицирован по цитозину (содержит цитозин) в нуклеотиде 101 SEQ ID NO: 1 или идентифицирован по цитозину (содержит цитозин) в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и/или по SEQ ID NO: 2, или по тимину в нуклеотиде 945 SEQ ID NO: 2, или по тимину в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2, и/или по SEQ ID NO: 3, или по тимину в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3, или по тимину в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3, и/или по SEQ ID NO: 4, или аденину в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4, или по аденину в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4, и/или по SEQ ID NO: 5, или по цитозину в нуклеотиде 839 SEQ ID NO: 5, или по цитозину в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5, и/или по SEQ ID NO: 6, или аденину в нуклеотиде 445 SEQ ID NO: 6, или по аденину в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6. QTL, придающий устойчивость к ToLCNDV, присутствует на фрагменте интрогрессии.

В контексте настоящего изобретения выражение "клетка растения донора" или "растение-донор" означает клетку дыни или растение дыни, которые обладают устойчивостью к ToLCNDV. Аналогичным образом, термин "фрагмент ДНК или фрагмент интрогрессии из растения-донора или клетки растения-донора" означает фрагмент хромосомы 5 растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, в результате чего этот фрагмент придает устойчивость к ToLCNDV при переносе в растение дыни, не обладающее устойчивостью к ToLCNDV. В предпочтительном варианте осуществления изобретения растение-донор представляет собой дикий вид или дикий образец дыни. В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления изобретения фрагменты ДНК или фрагменты интрогрессии из растений-доноров или клеток растений-доноров представляют собой донорные фрагменты, полученные из растений, выращенных из семян, депонированных под № NCLMB 42585, или из потомства, полученного из растений, выращенных из семян, депонированных под № NCLMB 42585, или из растений, полученных пу-

тем скрещивается с растениями, выращенными из семян, депонированных под № NCLMB 42585.

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

В контексте настоящего изобретения растения-доноры предпочтительно имеют средний уровень выраженности симптомов равный или выше 5.0, более предпочтительно равный или выше 6.0, более того, предпочтительно равный или выше 7.0, еще более предпочтительно равный или выше 8.0 и наиболее предпочтительный равный или выше 9.0. В соответствии с одним аспектом растение-донор содержит донорный генотип SNP для одного или нескольких или всех SNP\_01, SNP\_2, SNP\_3, SNP\_04, SNP\_05 и SNP\_06, как показано в табл. 2. Предпочтительно донорный генотип SNP является гомозиготным. В соответствии с настоящим изобретением термин "донор", например, относится к дикой дыне, не имеющей агрономической ценности, например к растению с белой мякотью, с низким содержанием сухих веществ и т.д.

В соответствии с настоящим изобретением термины "рекуррентная растительная клетка" или "рекуррентное растение" или "растение-реципиент" означают растение или клетку растения дыни, которое является чувствительным (синоним - "восприимчивым") или которое не обладает устойчивостью к инфекции ToLCNDV. Является ли растение чувствительным или обладает ли оно устойчивостью к ToLCNDV, можно определить, наблюдая уровни выраженности симптомов после инфицирования ToLCNDV. Рекуррентное растение предпочтительно имеет средний уровень выраженности симптомов ниже 3,0, более предпочтительно равный или ниже 2,5 или равный или ниже 2,0. Уровни выраженности симптомов и способы заражения растений дыни ToLCNDV описаны по тексту настоящего документа и применяются здесь соответственно. В предпочтительном варианте осуществления изобретения клетка рекуррентного растения дыни по настоящему изобретению получена из культурного растения дыни или рекуррентное растение дыни по настоящему изобретению представляет собой культурное растение дыни. Предпочтительно это элитная линия, линия разведения или сорт.

Термин "фрагмент интрогрессии" относится к фрагменту хромосомы, части или участку хромосомы, который был введен в другое растение того же или родственного вида путем скрещивания или традиционными методами селекции. В результате интрогрессии фрагмента из растения-донора в рекуррентное растение потомство, полученное в результате скрещивания растения-донора и рекуррентного растения, приобретает фенотип, отсутствующий в рекуррентном растении. В контексте настоящего изобретения фенотип, перенесенный из растения-донора в рекуррентное растение, является устойчивостью к ToLCNDV, например, средний индекс активности заболевания в таком растении составляет 5.0. Для интрогрессии фрагмента в определенную селекционную линию или сорт первый этап скрещивания может, например, сопровождаться одним или несколькими обратными скрещиваниями с предполагаемой линией разведения или сортом. При использовании по тексту настоящего документа термин "интрогрессия" может относиться к первому скрещиванию растения-донора, устойчивого к ToLCNDV, с рекуррентным растением, не обладающим устойчивостью к ToLCNDV, и дальнейшему обратному скрещиванию одного или нескольких растений, устойчивых к ToLCNDV, полученных в результате первого скрещивания, с растениями-реципиентами, которые должны приобрести устойчивость к ToLCNDV. В таком случае интрогрессированный фрагмент является результатом применения методов размножения, для которых используется термин "интрогрессия" (таких как обратное скрещивание), в отношении реципиентного сорта или линии размножения. Таким образом, интрогрессия признака устойчивости к ToLCNDV в рекуррентное растение - это технический антропогенный процесс. В частности, в настоящем документе термин "интрогрессия" относится к процессу или способу искусственного разведения. В таком процессе могут использоваться один или несколько или все молекулярные маркеры (маркеры SNP) в соответствии с настоящим изобретением. Полученное растение, т.е. культурная линия или сорт, которые содержат один фрагмент интрогрессии (на хромосоме 5) от донора, т.е. содержат рекомбинантную хромосому 5, также является искусственным и не существует в природных условиях.

Фрагмент интрогрессии может быть большим, например, он может составлять половину хромосомы, однако предпочтительно он меньше, например, около 15 Мб или менее, например около 10 Мб или менее, около 9 Мб или менее, около 8 Мб или менее, около 7 Мб или менее, около 6 Мб или менее, около 5 Мб или менее, около 4 Мб или менее, около 3 Мб или менее, около 2 Мб или менее, около 1 Мб (что равно 1000000 оснований или менее) или около 0,8 Мб (что равно 800000 пар оснований) или менее.

Фрагмент интрогрессии может происходить из дикого растения дыни или дикого образца дыни или диких родственников дыни или местных сортов (донор). Дикие растения дыни или образцы дикой дыни или дикие родственники растений или местные сорта дыни могут использоваться для интрогрессии фрагментов донорного генома в геном культурной дыни *Cucumis melo* для создания линий скрещивания или сортов с хорошими агрономическими характеристиками. Таким образом, такое культурное растение дыни имеет "геном культурного растения *C. melo*", однако содержит в своем геноме фрагмент донора, например, фрагмент интрогрессии родственного дикого генома *Cucumis genome*, например, *Cucumis melo* ssp. *agrestis*, *C. melo* ssp. *melo*, *C. melo* ssp. *a cidulous*, *C. callosus*, *C. trigonus*, *C. pictocarpus* или другой дикой дыни или дикого родственника дыни. Очевидно, что термин "фрагмент интрогрессии" никогда не включает в себя целую хромосому, а только часть хромосомы. Следовательно, хромосомы, несущие интрогрессию, также включают часть или части рекуррентного растения дыни (растения-реципиента) и, кроме того, части растения-донора дыни.

Когда хромосома 5 культурной дыни содержит фрагмент интрогрессии, это, следовательно, означает, что культурное растение дыни содержит рекомбинантную хромосому 5, в результате чего интрогрессированный фрагмент включает QTL, придающий признак устойчивости к ToLCNDV. Как описано по тексту, фрагмент интрогрессии от донора может содержать один или несколько или все донорные нуклеотиды SNP (для SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 и/или SNP\_06) или одну или несколько или все последовательности, содержащие донорные нуклеотиды SNP (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и/или SEQ ID NO: 6).

Таким образом, например, фрагмент интрогрессии (в гомозиготной или гетерозиготной форме) может содержать и может быть идентифицирован по одному или нескольким или всем следующим генотипам SNP: генотип CC или CT для SNP\_01 в SEQ ID NO: 1, и/или TT или TG генотип для SNP\_02 в SEQ ID NO: 2, и/или TT или TC генотип для SNP\_03 в SEQ ID NO: 3, и/или AA или AG генотип для SNP\_04 в SEQ ID NO: 4, и/или CC или CT генотип для SNP\_05 в SEQ ID NO: 5, и/или AA или AG генотип для SNP\_06 в SEQ ID NO: 6.

В соответствии с настоящим изобретением в одном аспекте нижняя часть хромосомы 5 культурной дыни ниже маркера CMGAAN144 на хромосоме 5 на странице 3 согласно работе Diaz et al., 2015 (Mol. Breeding, 35:188) или между маркером CMGAAN144 и маркером AI\_13-H12 содержит QTL5 от донора.

В соответствии с одним аспектом растение-донор по изобретению не является растением из пяти образцов *Cucumis melo* подвид *agrestis* (подвид *agrestis* var. *momordica*: Mom-Khalnd/ Kharbuja, Mom-PI124Ind/PI124I12, Mom-PI124Ind/PI414723 и подвид *agrestis* дикие типы: Ag-WM9Ind/WM9, Ag-WM7Ind/WM7), которые обладают устойчивостью к ToLCNDV, идентифицированным Lopez et al., 2015, *Euphytica*, 204(3), 679-691.

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 (т.е. иные методы, которые не включают генетическую модификацию), с помощью которых, например, может осуществляться получение, идентификация и/или перенос рекомбинантной хромосомы 5.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фрагмент интрогрессии происходит из дикого растения *Cucumis* или дикого образца *Cucumis*, наиболее предпочтительно фрагмент интрогрессии происходит из дикого *Cucumis melo* ssp. *melo*, с мелкими плодами (длиной не более 6 см), с белой мякотью плода с кислым вкусом. В настоящем изобретении использовался этот донор, однако специалист сможет определить других доноров, которые включают, например, тот же генотип SNP для SNP\_01-SNP\_06 и содержат QTL в той же области хромосомы 6.

В соответствии с одним аспектом подходящим донором является дикое растение или образец *C. melo*, имеющие средний индекс активности заболевания

ToLCNDV по меньшей мере 7.0 или по меньшей мере 7.1, 7.2, 7.3 или 7.4 или 7.5 или 7.6 по шкале от 1 = мертвое растение до 9 = отсутствие симптомов, которое включает один или несколько или все из следующих генотипов SNP: CC или CT генотип для SNP\_01 в SEQ ID NO: 1, и/или TT или TG генотип для SNP\_02 в SEQ ID NO: 2, и/или TT или TC генотип для SNP\_03 в SEQ ID NO: 3, и/или AA или AG генотип для SNP\_04 в SEQ ID NO: 4, и/или CC или CT генотип для SNP\_05 в SEQ ID NO: 5, и/или AA или AG генотип для SNP\_06 в SEQ ID NO: 6.

"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 получаются из определенного генотипа или комбинации генотипов, которую можно отличить от любой другой группы растений на основании экспрессии по меньшей мере одной из этих характеристик и которая может рассматриваться как единое целое, потому что при размножении таких растений не происходит каких-либо изменений. Таким образом, термин "сорт растения" не может использоваться для обозначения группы растений, даже если они того же рода, если все они характеризуются наличием одного или двух локусов или генов (или фенотипических характеристик в связи с такими специфическими

локусами или генами), но в противном случае могут чрезвычайно отличаться друг от друга относительно других локусов и генов.

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

Растение "гибрид F1" или (семя "гибрид F1") - это поколение, полученное путем скрещивания двух инбредных родительских линий. Таким образом, гибридные семена F1 представляют собой семена, из которых выращиваются 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.

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

В предпочтительном частном варианте осуществления изобретения растения и клетки растения по настоящему изобретению характеризуется тем, что фрагмент интрогрессии, придающий устойчивость к ToLCNDV, получен из семян, депонированных под NCIMB 42585, или из их потомства.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения клетка растения дыни по настоящему изобретению получена из культурного растения дыни, или растение дыни по настоящему изобретению представляет собой культурное растение дыни и фрагмент интрогрессии получен из дикого растения *Cucumis* или из дикого образца *Cucumis* или из растений-доноров, описанных в настоящем документе как предпочтительные растения-доноры, или полученных из семян, депонированных под NCIMB 42585, или из их потомства.

В контексте настоящего изобретения "хромосома 5 растения дыни" означает скаффолды, фрагменты, области, маркеры и нуклеотидные последовательности, которые в соответствии с данными ICuGI (Международной инициативы по геному тыквенных культур) принадлежат хромосоме 5 генома дыни.

Термин "ортологичная хромосома 5" относится к хромосоме 5 диких родственников дыни, части которой могут быть интрогрессированы в хромосому 5 культурной дыни.

Термин "рекомбинантная хромосома" относится к хромосоме с новой генетической структурой, возникающей в результате скрещивания между гомологичными хромосомами, например "рекомбинантная хромосома 5" означает хромосому 5, которая не присутствует ни в одном из родительских растений и возникла в результате редкого события кроссинговера между гомологичными хромосомами пары хромосом 5. Например, в соответствии с настоящим изобретением предоставляется рекомбинантная хромосома 5 дыни, содержащая QTL, придающий устойчивость к ToLCNDV. Таким образом, рекомбинантная хромосома 5 представляет собой хромосому культурной дыни с фрагментом интрогрессии из дикого донора, в результате чего фрагмент интрогрессии включает QTL, придающий признак устойчивости к ToLCNDV.

В настоящем документе термин "ICuGI" относится к данным о *Cucumis melo*, опубликованным Международной инициативой по геному тыквенных культур, которая публикует генетические карты, например, *Cucumis melo* ([http://www.icugi.org/cgi-bin/cmap/mapset\\_info?speciesacc=CM](http://www.icugi.org/cgi-bin/cmap/mapset_info?speciesacc=CM)). Текущая версия CM\_3.5.1 карты генома *C. melo* от 4 марта 2012 г., а карта хромосомы 5 именуется ICuGI\_V (или LG\_V, или Linkage Group V). Дополнительную информацию, включая дополнительную информацию о маркерах и информацию о картировании в дополнение к данным ICuGI, можно найти в работе Diaz et al. (2015, Mol. Breeding., 35, 188), а также в дополнительных данных, включенных в онлайн-версию соответствующей статьи.

Термин "культурное растение дыни" означает растения вида *Cucumis melo*, т.е. разновидности, линии скрещивания или сорта вида *C. melo*, которые культивируются человеком и имеют высокие агрономические характеристики, в частности растения, дающие съедобные плоды, обладающие нормальным рыночным качеством, хорошего размера и качества, а также обладающие достаточной однородностью; такие растения не являются растениями "дикого типа", т.е. растениями, которые, как правило, обладают значительно меньшей урожайностью и худшими агрономическими характеристиками по сравнению с культурными растениями и которые, например, растут в природных условиях в диких популяциях. Растения "дикого типа" включают, например, экотипы, линии интродукции растений, местные сорта, дикие образцы или дикие родственники вида.

В контексте настоящего изобретения термин "SNP" (=одиночный нуклеотидный полиморфизм)"

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

Термин "нуклеотид SNP" относится к одному нуклеотиду, а термин "генотип SNP" относится к паре нуклеотидов в диплоидной клетке растения. Так, для SNP\_01 нуклеотидом SNP донора устойчивого к ToLCNDV является цитозин (С) для нуклеотида 101 SEQ ID NO: 1, тогда как генотипом SNP растения или клетки, содержащим SEQ ID NO: 1, может быть СС (цитозин в обеих хромосомах) или СТ (цитозин в одной хромосоме и тимин в другой хромосоме), в результате чего нуклеотид SNP (цитозин) донора устойчивого к ToLCNDV и, следовательно, SEQ ID NO: 1 (или последовательность с существенной степенью идентичности SEQ ID NO: 1) является гомозиготным или гетерозиготным. Термин "генотип SNP донора" относится к нуклеотиду SNP донора, присутствующему в гомозиготной или гетерозиготной форме, т.е. для SNP\_01 генотипом SNP донора является СС или СТ.

В контексте настоящего изобретения термин "SNP\_01", который альтернативно именуется "mME11320\_k", означает SNP в положении 101 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с данными ICuGI SEQ ID NO: 1 или последовательность с существенной степенью идентичности SEQ ID NO: 1 можно найти на хромосоме 5. Относительное положение SNP\_01 согласно маркерам, опубликованным ICuGI, может быть выведено из табл. 1. Предпочтительно нуклеотидная последовательность, содержащая SNP\_01, имеет нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1, более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1, еще более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1, в частности предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1 или более конкретно предпочтительно по меньшей мере 99,5% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 1, при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 101 в SEQ ID NO: 1 отличен от соответствующего нуклеотида в том же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, именуются последовательностями со значительной идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1.

Растения-доноры, обладающие устойчивостью к ToLCNDV, в соответствии с изобретением имеют С (цитозин) в положении 101 в SEQ ID NO: 1 или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения SNP\_01 характеризуется тем, что рекуррентное растение имеет А, G или Т в положении 101 в SEQ ID NO: 1. В соответствии с одним аспектом изобретения рекуррентное растение имеет Т в положении 101 в SEQ ID NO: 1.

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения SNP\_01 характеризуется тем, что растение-донор имеет С в положении 101 в SEQ ID NO: 1 (или в эквивалентном положении в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1) и рекуррентное растение имеет Т в положении 101 в SEQ ID NO: 1.

В контексте настоящего изобретения термин "SNP\_02", который альтернативно именуется "mME43070\_k", означает SNP в положении 945 в SEQ ID NO: 2. В соответствии с данными ICuGI SEQ ID NO: 2 или последовательность с существенной степенью идентичности SEQ ID NO: 2 можно найти на хромосоме 5. Относительное положение SNP\_02 согласно маркерам, опубликованным ICuGI, может быть выведено из табл. 1. Предпочтительно нуклеотидная последовательность, содержащая SNP\_02, имеет нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 2, более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 2, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 2, еще более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 2, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 2, в частности предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 2 или более конкретно предпочтительно по меньшей мере 99,5% идентичности с нуклеотид-

ной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 2 при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 945 в SEQ ID NO: 2 отличен от соответствующего нуклеотида в том же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, рассматривают как имеющие существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

Растения-доноры, обладающие устойчивостью к ToLCNDV, в соответствии с изобретением имеют Т (тимин) в положении 945 в SEQ ID NO: 2 или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения SNP\_04 характеризуется тем, что рекуррентное растение имеет А, С или G в положении 945 в SEQ ID NO: 2 или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

В соответствии с одним аспектом изобретения рекуррентное растение имеет G (гуанин) в положении 945 в SEQ ID NO: 2 или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

В соответствии с частным вариантом осуществления изобретения SNP\_02 характеризуется тем, что растение-донор имеет Т в положении 945 в SEQ ID NO: 2 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2) и рекуррентное растение имеет G в положении 945 в SEQ ID NO: 2 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2).

В контексте настоящего изобретения термин "SNP03", который альтернативно именуется "mME10621\_k", означает SNP в положении 68 в SEQ ID NO: 3. В соответствии с данными ICuGI SEQ ID NO: 3 или последовательность с существенной степенью идентичности SEQ ID NO: 3 можно найти на хромосоме 5. Относительное положение SNP\_03 согласно маркерам, опубликованным ICuGI, может быть выведено из табл. 1. Предпочтительно нуклеотидная последовательность, содержащая SNP\_03, имеет нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3, более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3, еще более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3, в частности предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3 или более конкретно предпочтительно по меньшей мере 99,5% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 3 при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 68 в SEQ ID NO: 3 отличен от соответствующего нуклеотида в том же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, рассматривают как имеющие существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3.

Растения-доноры, обладающие устойчивостью к ToLCNDV, в соответствии с изобретением имеют Т (тимин) в положении 68 в SEQ ID NO: 3 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3). В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения SNP\_03 характеризуется тем, что рекуррентное растение имеет А, С или G в положении 68 в SEQ ID NO: 3 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3). В соответствии с одним аспектом изобретения рекуррентное растение имеет С в положении 68 в SEQ ID NO: 3 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3).

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения SNP\_03 характеризуется тем, что растение-донор имеет Т в положении 68 в SEQ ID NO: 3 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3) и рекуррентное растение имеет С в положении 68 в SEQ ID NO: 3 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3).

В контексте настоящего изобретения термин "SNP\_04", который альтернативно именуется "mME50729\_k", означает SNP в положении 227 в SEQ ID NO: 4. В соответствии с данными ICuGI SEQ ID NO: 4 или последовательность с существенной степенью идентичности SEQ ID NO: 4 можно найти на хромосоме 5. Относительное положение SNP\_04 согласно маркерам, опубликованным ICuGI, может быть выведено из табл. 1. Предпочтительно нуклеотидная последовательность, содержащая SNP\_04, имеет нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4, более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4, еще более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4, еще более предпочтительно по меньшей мере 98%

идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4, в частности предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4 или более конкретно предпочтительно по меньшей мере 99,5% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 4 при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 227 в SEQ ID NO: 4 отличен от соответствующего нуклеотида в том же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, рассматривают как имеющие существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4.

Растения-доноры, обладающие устойчивостью к ToLCNDV, в соответствии с изобретением имеют А (аденин) в положении 227 в SEQ ID NO: 4 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4). В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения SNP\_04 характеризуется тем, что рекуррентное растение имеет С, Т или G в положении 227 в SEQ ID NO: 4 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4). В соответствии с одним аспектом изобретения рекуррентное растение имеет G в положении 227 в SEQ ID NO: 4 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4).

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения SNP\_04 характеризуется тем, что растение-донор, обладающее устойчивостью к ToLCNDV, имеет А в положении 227 в SEQ ID NO: 4 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4), и рекуррентное растение имеет G в положении 227 в SEQ ID NO: 4 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4).

В контексте настоящего изобретения термин "SNP\_05", который альтернативно именуется "mME32395\_k", означает SNP в положении 839 в SEQ ID NO: 5. В соответствии с данными ICuGI SEQ ID NO: 5 или последовательность с существенной степенью идентичности SEQ ID NO: 5 можно найти на хромосоме 5. Относительное положение SNP\_05 согласно маркерам, опубликованным ICuGI, может быть выведено из табл. 1. Предпочтительно нуклеотидная последовательность, содержащая SNP\_05, имеет нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 5, более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 5, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 5, еще более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 5, еще наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 5, в частности, предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 5 или более конкретно предпочтительно по меньшей мере 99,5% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 5 при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 839 в SEQ ID NO: 5 отличен от соответствующего нуклеотида в том же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, рассматривают как имеющие существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5.

Растения-доноры, обладающие устойчивостью к ToLCNDV, в соответствии с изобретением имеют С (цитозин) в положении 839 в SEQ ID NO: 5 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5). В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения SNP\_05 характеризуется тем, что рекуррентное растение имеет А, Т или G в положении 839 в SEQ ID NO: 5 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5). В соответствии с одним аспектом изобретения рекуррентное растение имеет Т в положении 839 в SEQ ID NO: 5 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5).

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения SNP\_05 характеризуется тем, что растение-донор, обладающее устойчивостью к ToLCNDV, имеет С в положении 839 в SEQ ID NO: 5 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5), и рекуррентное растение имеет Т в положении 839 в SEQ ID NO: 5 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5).

В контексте настоящего изобретения термин "SNP\_06", который альтернативно именуется "mME49184\_k", означает SNP в положении 445 в SEQ ID NO: 6. В соответствии с данными ICuGI SEQ ID NO: 6 или последовательность с существенной степенью идентичности SEQ ID NO: 6 можно найти на хромосоме 5. Относительное положение SNP\_06 согласно маркерам, опубликованным ICuGI, может быть выведено из табл. 1. Предпочтительно нуклеотидная последовательность, содержащая SNP\_06, имеет нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 6, более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 6, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной

под SEQ ID NO: 6, еще более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 6, еще наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 6, в частности предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 6 или более конкретно предпочтительно по меньшей мере 99,5% идентичности с нуклеотидной последовательностью, показанной под SEQ ID NO: 6 при условии, что в каждом случае нуклеотид в положении 445 в SEQ ID NO: 6 отличен от соответствующего нуклеотида в том же положении рекуррентного растения. Такие последовательности, имеющие по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6, рассматривают как имеющие существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6.

Растения-доноры, обладающие устойчивостью к ToLCNDV, в соответствии с изобретением имеют А (аденин) в положении 445 в SEQ ID NO: 6 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6). В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения SNP\_06 характеризуется тем, что рекуррентное растение имеет С, Т или G в положении 445 в SEQ ID NO: 6 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6). В соответствии с одним аспектом изобретения рекуррентное растение имеет G в положении 445 в SEQ ID NO: 6 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6).

В соответствии с частным вариантом осуществления изобретения SNP\_06 характеризуется тем, что растение-донор, обладающее устойчивостью к ToLCNDV, имеет А в положении 445 в SEQ ID NO: 6 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6) и рекуррентное растение имеет G в положении 445 в SEQ ID NO: 6 (или в последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6).

Таблица 1

Наименование маркера	Тип маркера	Хромосома	Координаты псевдомолекулы	cM Garcia-Mas et al. (2012)	cM Argyris et al. (2015)	LG_ICuGI	cM_ICuGI	Scaffold v3.5.1 (адрес в Интернете: melonomics.net)	Координаты скаффолда
CMPSNP460	SNP	5	12.966.671	57,3				CM3.5.1_scaffold00009	1.816.109
SNP_06	SNP	5						CM3.5.1_scaffold00009	2.607.437
CMPSNP682	SNP	5	15.854.444	57,3	50,4			CM3.5.1_scaffold00009	4.703.882
CMN62_05	SSR	5	16.570.623					CM3.5.1_scaffold00009	5.420.061
CMPSNP1005	SNP	5	17.239.621	57,3	50,4			CM3.5.1_scaffold00009	6.089.059
CMN61_15	SSR	5	17.453.772					CM3.5.1_scaffold00009	6.303.210
CMPSNP39	SNP	5	17.651.074	57,3				CM3.5.1_scaffold00009	6.500.512
PS_03-B08	SNP	5	18.119.560	57,3	50,4			CM3.5.1_scaffold00009	6.968.998
ECM203	SSR	5	18.459.732					CM3.5.1_scaffold00009	7.309.170
CMPSNP2005	SNP	5	18.833.037		50,4			CM3.5.1_scaffold00009	7.682.475
CMN01_49	SSR	5	19.305.580					CM3.5.1_scaffold00003	26.051
ECM142	SSR	5	19.743.282			5	54	CM3.5.1_scaffold00003	463.753
CMGAN3	SSR	5	19.871.767			5	56	CM3.5.1_scaffold00003	592.238
CMPSNP1018	SNP	5	20.088.198	50,9	50,7			CM3.5.1_scaffold00003	808.669
CMPSNP613	SNP	5	20.406.864					CM3.5.1_scaffold00003	1.127.335
CMN05_89	SSR	5	21.514.552					CM3.5.1_scaffold00003	2.235.023
CMN23_06	SSR	5	21.949.502					CM3.5.1_scaffold00003	2.669.973

GCM295	SSR	5	23.318.454					CM3.5.1_scaffold00003	4.038.925
CMPSNP741	SNP	5	23.620.132					CM3.5.1_scaffold00003	4.340.603
ECM115	SSR	5	23.786.719					CM3.5.1_scaffold00003	4.507.190
CMPSNP1136	SNP	5	24.100.004	67,0	67,7			CM3.5.1_scaffold00003	4.820.475
ECM206	SSR	5	24.175.232					CM3.5.1_scaffold00003	4.895.703
CMCTN2	SSR	5	24.313.118			5	73	CM3.5.1_scaffold00003	5.033.589
CMGAAN144	SSR	5	24.403.405			5	73	CM3.5.1_scaffold00003	5.123.876
SNP_05	SNP	5						CM3.5.1_scaffold00003	5.202.092
3J84-496	SNP	5	24.884.331					CM3.5.1_scaffold00003	5.604.802
3J84-19	SNP	5	24.884.834					CM3.5.1_scaffold00003	5.605.305
60k53-404	SNP	5	25.036.462					CM3.5.1_scaffold00003	5.756.933
60k53-147	SNP	5	25.036.692					CM3.5.1_scaffold00003	5.757.163
60k53-80	SNP	5	25.036.780					CM3.5.1_scaffold00003	5.757.251
60k49-351	SNP	5	25.040.592					CM3.5.1_scaffold00003	5.761.063
60k49-307	SNP	5	25.040.689					CM3.5.1_scaffold00003	5.761.160
60k49-182	SNP	5	25.040.770					CM3.5.1_scaffold00003	5.761.241
60k45.389	SNP	5	25.043.452	73,4				CM3.5.1_scaffold00003	5.763.923
60k45.288	SNP	5	25.043.521					CM3.5.1_scaffold00003	5.763.992
60k45.213	SNP	5	25.043.624					CM3.5.1_scaffold00003	5.764.095
60k45.14	SNP	5	25.043.807	73,4				CM3.5.1_scaffold00003	5.764.278
60k42-490	SNP	5	25.045.798					CM3.5.1_scaffold00003	5.766.269
60k42-411	SNP	5	25.045.907					CM3.5.1_scaffold00003	5.766.378
60k42-126	SNP	5	25.046.183	76,6				CM3.5.1_scaffold00003	5.766.654
60k42-29	SNP	5	25.046.269					CM3.5.1_scaffold00003	5.766.740
60k41.333	SNP	5	25.047.374					CM3.5.1_scaffold00003	5.767.845
60k41.243	SNP	5	25.047.449	73,4				CM3.5.1_scaffold00003	5.767.920
60k41.49	SNP	5	25.047.654					CM3.5.1_scaffold00003	5.768.125
SNP_04	SNP	5						CM3.5.1_scaffold00003	5.785.550
CMTAAN128	SSR	5	25.081.134			5	72	CM3.5.1_scaffold00003	5.801.605
CMTAN138	SSR	5	25.081.134			5	70	CM3.5.1_scaffold00003	5.801.605
CMTAN139	SSR	5	25.081.134			5	70	CM3.5.1_scaffold00003	5.801.605
CMPSNP588	SNP	5	25.271.831	75,0	78,3			CM3.5.1_scaffold00003	5.992.302
CMPSNP464	SNP	5	25.639.164	75,8				CM3.5.1_scaffold00003	6.359.635
SNP_03	SNP	5						CM3.5.1_scaffold00003	6.553.350
CMPSNP 1155	SNP	5	26.124.693	79,8				CM3.5.1_scaffold00003	6.845.164
SNP_02	SNP	5						CM3.5.1_scaffold00003	6.950.286
CMPSNP690	SNP	5	26.340.629	79,8	90,0			CM3.5.1_scaffold00003	7.061.100
CMTCN227	SSR	5	26.453.003			5	61	CM3.5.1_scaffold00003	7.173.474
CMPSNP1115	SNP	5	26.639.938	84,6				CM3.5.1_scaffold00003	7.360.409
ECM213	SSR	5	26.907.003					CM3.5.1_scaffold00003	7.627.474
SNP_01	SNP	5						CM3.5.1_scaffold00003	7.824.960
AI_13-H12	SNP	5	27.276.249	89,4				CM3.5.1_scaffold00003	7.996.720

Описанные в настоящем документе молекулярные маркеры могут быть обнаружены стандартными методами. Например, маркеры SNP могут быть обнаружены путем KASP-анализа (см. [www.kpbioscience.co.uk](http://www.kpbioscience.co.uk)) или других видов анализа. Для описанных в настоящем документе SNP был разработан KASP-анализ. Более подробная информация представлена в разделе "Примеры". Последовательности, используемые в соответствующих KASP-анализах, приведены в перечне последовательностей. Для разработки KASP-анализов для SNP в соответствии с сведениями общедоступного характера в этой области были разработаны два аллель-специфических прямых праймера и один аллель-специфический обратный праймер (см., например, Allen et al., 2011, Plant Biotechnology J., 9, 1086-1099, в частности, p097-098 для KASP-анализа).

"Идентичность последовательности" и "сходство последовательности" можно определить путем выравнивания двух пептидных или двух нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритмов глобального или локального выравнивания. Таким образом, последовательности могут именоваться "существенно идентичными" или "с существенной степенью идентичности", когда они имеют определенный общий минимальный процент идентичности последовательности (в соответствии с определением ниже) при оптимальном выравнивании с использованием программных средств GAP или BESTFIT или программы Needle (пакет Emboss) с параметрами по умолчанию, см. ниже. Эти программы используют алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей длине, получая максимальное количество совпадений и сводя к минимуму количество делеций. Обычно используются 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 используется матрица 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/](http://ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)). В качестве альтернативы процент сходства или идентичности может определяться путем поиска в базах данных, таких как FASTA, BLAST и т.д., однако для сравнения идентичности последовательности совпадения должны быть получены и приведены в соответствие попарно. Два белка или два белковых домена или две нуклеотидные последовательности имеют "существенную идентичность последовательности", если процент идентичности последовательности составляет по меньшей мере 85, 90, 95, 98, 99% или более (например по меньшей мере 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 или более (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), имеющей "существенную идентичность последовательности" с эталонной последовательностью или имеющей идентичность последовательности по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85, 90, 95, 98, 99, 99,2, 99,5, 99,9% идентичности нуклеотидной последовательности 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. В еще одном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность содержит одну или несколько мутаций по сравнению с определенной нуклеотидной последовательностью, однако она все же может быть идентифицирована с использованием жестких условий гибридизации.

Для культурных растений дыни, содержащих фрагмент, придающий устойчивость к ToLCNDV, интрогрессированный в хромосому 5, демонстрируется снижение симптомов при инфицировании ToLCNDV, в то время для контрольных чувствительных растений (без фрагмента интрогрессии) в тех же условиях проявляются ожидаемые тяжелые симптомы.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения растения или клетки растения по настоящему изобретению характеризуется тем, что после их инфицирования ToLCNDV средняя степень выраженности симптомов составляет по меньшей мере 4,0, более предпочтительно по меньшей мере 5,0. Как было указано ранее, QTL5 придает устойчивость, когда QTL находится в гомозиготной или гетерозиготной форме. Из восприимчивого к ToLCNDV растения, в которое вводится фрагмент интрогрессии, содержащий QTL5, путем, например, обратного скрещивания и самоопыления которого при необходимости осуществляется для получения гомозиготного фрагмента интрогрессии (содержащего генотип донора для одного или нескольких или всех из SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 и SNP\_06 в гомозиготной форме), получают растение, обладающее устойчивостью к инфицированию ToLCNDV, средний индекс активности заболевания которого составляет по меньшей мере 4,0, предпочтительно по меньшей мере 5,0, предпочтительно по меньшей мере 6,0 или предпочтительно по меньшей мере 7,0. Уровни выраженности симптомов, возникающие после заражения ToLCNDV, между 1 и 9, где 1 определяется как уровень с наиболее тяжелыми симптомами, а 9 определяется как наивысший уровень устойчивости, были описаны в настоящем документе выше и применяются соответственно. Предпочтительный тест для определения уровней выраженности симптомов приведен ниже в разделе "Общие методы".

В еще одном варианте осуществления изобретения растения или клетки растения по настоящему изобретению характеризуется тем, что после их инфицирования ToLCNDV степень выраженности симптомов находится в диапазоне 4-6, более предпочтительно степень выраженности симптомов находится в диапазоне 5-6, в то время как восприимчивые контрольные растения проявляют степень выраженности симптомов составляет 2 или менее.

Устойчивость к ToLCNDV, которая придается фрагментом интрогрессии, выражается доминантным образом, таким образом, она может наблюдаться, когда лишь одна хромосома 5 содержит фрагмент интрогрессии, содержащий последовательность растения-донора между маркерами хромосомы 5, описанными в настоящем документе.

Таким образом, другие частные варианты осуществления изобретения относятся к растениям дыни или клеткам растений дыни по настоящему изобретению, в которых фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, содержащий последовательность растения-донора между SNP\_01 и SNP\_06, между SNP\_01 и SNP\_05, между SNP\_01 и SNP\_04, между SNP\_02 и SNP\_06, между SNP\_02 и SNP\_05, между SNP\_02 и SNP\_04, между SNP\_03 и SNP\_06, между SNP\_03 и SNP\_05 или предпочтительно между SNP\_03 и SNP\_04 присутствует в гетерозиготном состоянии. Соответственно достаточно, чтобы по меньшей мере одна хромосома 5 в клетках растений по изобретению или в растениях по изобретению содержала описанный фрагмент интрогрессии. Однако понятно, что хромосома 5 по отношению к описанному фрагменту интрогрессии также может присутствовать в гомозиготном состоянии без уменьшения степени устойчивости из-за доминантной устойчивости к ToLCNDV, которая придается описанным фрагментом интрогрессии. Таким образом, настоящим изобретением охватываются растения или клетки растений по настоящему изобретению, содержащие описанный фрагмент интрогрессии в гетерозиготном или гомозиготном состоянии.

В табл. 2 приведен генотип SNP растений или клеток, содержащих донорные SNP, обладающие устойчивостью к ToLCNDV, в гомозиготной или гетерозиготной форме, а также генотип SNP рекуррентного родительского растения, в котором отсутствует фрагмент интрогрессии.

Таблица 2

SNP и положение нуклеотида (nt) в последовательности	Генотип SNP в растении дыни, включающем донорный фрагмент в гомозиготной форме	Генотип SNP в растении дыни, включающем донорный фрагмент в гетерозиготной форме	Генотип SNP рекуррентного родителя, в котором фрагмент интрогрессии отсутствует
SNP_01 (nt 101 SEQ ID NO: 1)	CC	CT	TT
SNP_02 (nt 945 SEQ ID NO: 2)	TT	TG	GG
SNP_03 (nt 68 SEQ ID NO: 3)	TT	TC	CC
SNP_04 (nt 227 SEQ ID NO: 4)	AA	AG	GG
SNP_05 (nt 839 SEQ ID NO: 5)	CC	CT	TT
SNP_06 (nt 445 SEQ ID NO: 6)	AA	AG	GG

В одном варианте осуществления предоставляется культурное растение дыни (вида *C. melo*), которое содержит рекомбинантную хромосому 5, в результате чего рекомбинантная хромосома 5 содержит фрагмент интрогрессии, который придает устойчивость к ToLCNDV растению дыни, если он присутствует в гомозиготной или гетерозиготной форме, при этом фрагмент интрогрессии получен от дикого донора вида *C. melo*. В соответствии с одним аспектом фрагмент интрогрессии содержит донорный генотип SNP для одного или нескольких или всех SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 и/или SNP\_06. В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения фрагмент интрогрессии содержит донорный генотип SNP по меньшей мере для SNP\_03 и/или SNP\_04. Генотип SNP донора может присутствовать в гомозиготной форме (если фрагмент интрогрессии находится в гомозиготной форме) или в гетерозиготной форме (если фрагмент интрогрессии находится в гетерозиготной форме). Таким образом, например, растение, клетка растения или часть растения могут содержать TT или TC генотип для SNP\_03 в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3. Таким образом, растение, клетка растения или часть растения могут содержать SEQ ID NO: 3 или последовательность, включающую по меньшей мере 95, 97 или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, в гомозиготной или гетерозиготной форме.

В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения предоставляются культурные растения дыни или клетки этих растений, которые содержат фрагмент интрогрессии от дикого донора на хромосоме 5, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии находится между SNP\_01 и SNP\_06 (или между SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6, или последовательностью, содержащей по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97 или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 6); или при этом фрагмент интрогрессии находится между SNP\_01 и SNP\_05 (или между SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 5, или последовательностью, содержащей по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97 или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 5).

В соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат

фрагмент интрогрессии от дикого донора на хромосоме 5, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии находится между SNP\_01 и SNP\_06 (или между SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6, или последовательностью, содержащей по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97 или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 6), или фрагмент интрогрессии находится между SNP\_01 и SNP\_05 (или между SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 5, или последовательностью, содержащей по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97 или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или с SEQ ID NO: 5), и при этом фрагмент интрогрессии содержит тимин (Т) в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 или в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3.

В соответствии с еще одним аспектом фрагмент интрогрессии, при необходимости, содержит аденин (А) нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4 или в эквивалентном нуклеотиде последовательности, имеющей существенную идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4.

В соответствии с еще одним аспектом фрагмент интрогрессии, при необходимости, содержит донорный нуклеотид SNP\_02 и/или SNP\_05. Таким образом, фрагмент интрогрессии может содержать донорный генотип для SNP\_03, SNP\_04 и SNP\_05; или для SNP\_03 и SNP\_02; или для SNP\_03 и SNP\_02 и SNP\_04; или для SNP\_03, SNP\_02, SNP\_04 и SNP\_05.

В соответствии с другим аспектом фрагмент интрогрессии при необходимости содержит донорный нуклеотид SNP\_02 и/или SNP\_01. Таким образом, фрагмент интрогрессии может содержать донорный генотип для SNP\_03 и SNP\_02; или для SNP\_03, SNP\_02 и SNP\_01; и при необходимости также для SNP\_04, и далее при необходимости также для SNP\_05, и далее при необходимости также для SNP\_06.

В соответствии с еще одним другим аспектом фрагмент интрогрессии при необходимости содержит донорный нуклеотид SNP\_05 и/или SNP\_06.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от дикого донора на хромосоме 5, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии находится между SNP\_01 и SNP\_06 (или между SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6, или последовательностью, содержащей по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97 или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 6), и при этом фрагмент интрогрессии содержит генотип SNP, обладающий устойчивостью к ToLCNDV, для одного или нескольких или для всех SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 и SNP\_06. В соответствии с одним аспектом фрагмент содержит донорный генотип SNP для SNP\_03 и/или SNP\_04.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от дикого донора на хромосоме 5, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии находится между SNP\_01 и SNP\_05 (или между SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6, или последовательностью, содержащей по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97 или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5), и при этом фрагмент интрогрессии содержит генотип SNP, обладающий устойчивостью к ToLCNDV, для одного или нескольких или для всех SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04 и SNP\_05. В соответствии с одним аспектом фрагмент содержит донорный генотип SNP для SNP\_03 и/или SNP\_04. При необходимости генотип устойчивости SNP также присутствует для SNP\_06.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от дикого донора на хромосоме 5, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии находится между SNP\_03 и SNP\_04 (или между SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6, или последовательностью, содержащей по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97 или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4), и при этом фрагмент интрогрессии при необходимости содержит генотип SNP, обладающий устойчивостью к ToLCNDV, для SNP\_03 и/или SNP\_04. При необходимости, донорный генотип также присутствует для одного или нескольких или всех маркеров SNP, выбранных из SNP\_01, SNP\_02, SNP\_05 и SNP\_06.

В соответствии с еще одним аспектом культурные растения дыни или клетки этих растений содержат фрагмент интрогрессии от дикого донора на хромосоме 5, причем этот фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент интрогрессии находится между SNP\_02 и SNP\_04 (или между SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4, или последовательностью, содержащую по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97 или 98% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4), при этом фрагмент интрогрессии при необходимости содержит генотип SNP, обладающий устойчивостью к ToLCNDV, для SNP\_02, и/или SNP\_03, и/или SNP\_04. При необходимости донорный генотип также присутствует для одного или нескольких или всех маркеров SNP, выбранных из SNP\_01, SNP\_05 и SNP\_06.

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

Растение дыни по настоящему изобретению может представлять собой инбредную линию, свободноопыляемый сорт (СОС) или гибрид F1. В соответствии с одним аспектом гибрид F1 содержит фрагмент интрогрессии в гетерозиготной форме, т.е. фрагмент интрогрессии, полученный путем скрещивания двух инбредных родительских линий, одна из которых содержит фрагмент интрогрессии (предпочтительно, но необязательно в гомозиготной форме) и сбора семян гибрида F1, полученного в результате такого скрещивания. Гибрид F1 также может содержать фрагмент интрогрессии в гомозиготной форме, т.е. полученный путем скрещивания двух инбредных родительских линий, каждая из которых содержит фрагмент интрогрессии в гомозиготной или гетерозиготной форме.

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

Также в растения дыни по изобретению могут быть введены другие виды устойчивости, такие как устойчивость к одному или нескольким из следующих заболеваний: бактериальное увядание, корневая гниль, завядание кроны, дынная ржавчина, настоящая мучнистая роса, вертициллезный вилт, серный ожог, парша, мозаика арбуза, ложная мучнистая роса, *Fusarium oxysporum* специализированная форма *melonis* (FOM) раса 0, *Fusarium oxysporum* специализированная форма *melonis* (FOM) раса 1, *Fusarium oxysporum* специализированная форма *melonis* (FOM) раса 2, *Fusarium oxysporum* специализированная форма *melonis* (FOM) раса 1.2, фузариозный вилт R2, корневой нарост (нематода), антракноз, мозаика огурца и мозаика кабачка, и/или устойчивость к одному или нескольким следующим вредителям: тля, огневка, чернотелка, жужелица, жук-блешка окаймленная, клещи, жук-блешка одиннадцатиточечная, дынная кобылочка, дынный червь, *Acalymma trivittata* или дынный листовой минер. Также могут вводиться другие гены устойчивости к патогенным вирусам, грибкам, бактериям или вредителям.

Специфический аспект изобретения относится к растениям или клеткам растений, содержащим фрагмент интрогрессии по изобретению, при этом такой фрагмент интрогрессии можно получить из семян, депонированных под NCIMB 42585, или из их потомства. Депонированные семена представляют собой культурные растения дыни поколения BC4S4, содержащие фрагмент интрогрессии в гомозиготной форме, причем донорный нуклеотид присутствует в гомозиготной форме для SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 и SNP\_06. Наиболее вероятно, что участок устойчивости к ToLCNDV находится между SNP\_03 и SNP\_04, это означает, что размер участка донорной интрогрессии может быть уменьшен путем выбора рекомбинантов с меньшим размером фрагментов интрогрессии. Таким образом, растения, содержащие субфрагменты фрагмента интрогрессии (причем указанные субфрагменты все-таки придают устойчивость к ToLCNDV), содержащие донорский SNP для SNP\_03 и/или SNP\_04, но имеющие генотип SNP рекуррентного родителя для одного или нескольких или всех других SNP, могут получены способами, известными специалисту.

Определить, приобрело ли растение участок устойчивости к ToLCNDV от депонированных семян (фрагмент интрогрессии того же размера или субфрагмент) можно различными методами, такими как секвенирование и сравнение последовательностей фрагментов интрогрессии и сайтов рекомбинации.

Растения и части растений дыни (такие как листья, стебли, корни, плоды, пыльца, цветки и т.д.), содержащие клетки растений дыни по изобретению, также являются вариантом осуществления настоящего изобретения. Аналогичным образом настоящее изобретение включает семена, из которых могут быть выращены такие растения, а также части таких семян (например, клетки или ткани семян, такие как оболочка семян, зародыш и т.д.).

Еще один аспект настоящего изобретения относится к семенам дыни, содержащим фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, в которых фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, между SNP\_01 и SNP\_06, между SNP\_01 и SNP\_05, между SNP\_01 и SNP\_04, между SNP\_02 и SNP\_06, между SNP\_02 и SNP\_05, между SNP\_02 и SNP\_04, SNP\_03 и SNP\_06, между SNP\_03 и SNP\_05 или между SNP\_03 и SNP\_04. В предпочтительном варианте осуществления изобретения семена содержат фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 устойчивого к ToLCNDV растения-донора, причем фрагмент интрогрессии содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV растения-донора между SNP\_01 и SNP\_06, более предпочтительно между SNP\_01 и SNP\_05, еще более предпочтительно между SNP\_02 и SNP\_05, кроме того, предпочтительно между SNP\_02 и SNP\_04 и наиболее предпочтительно между SNP\_03 и SNP\_04.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к семенам дыни, получаемым или полученным из растений по изобретению, или к семенам, содержащим клетки растений по настоящему изобретению.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к плодам дыни, содержащим фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, в которых фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора дыни, обладающего устойчивостью к

ToLCNDV, между SNP\_01 и SNP\_06, между SNP\_01 и SNP\_05, между SNP\_01 и SNP\_04, между SNP\_02 и SNP\_06, между SNP\_02 и SNP\_05, между SNP\_02 и SNP\_04, SNP\_03 и SNP\_06, между SNP\_03 и SNP\_05 или между SNP\_03 и SNP\_04. В предпочтительном варианте осуществления изобретения семена содержат фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 устойчивого к ToLCNDV растения-донора, причем фрагмент интрогрессии содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV растения-донора между SNP\_01 и SNP\_06, более предпочтительно между SNP\_01 и SNP\_05, еще более предпочтительно между SNP\_02 и SNP\_05, кроме того, предпочтительно между SNP\_02 и SNP\_04 и наиболее предпочтительно между SNP\_03 и SNP\_04.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения относится к плодам дыни, получаемым или полученным из растений по изобретению, или к плодам, содержащим клетки растений по настоящему изобретению.

Предпочтительно плоды дыни по настоящему изобретению отличаются тем, что они содержат фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, содержащего последовательность растения-донора между SNP\_01 и SNP\_06, между SNP\_01 и SNP\_05, между SNP\_01 и SNP\_04, между SNP\_02 и SNP\_06, между SNP\_02 и SNP\_05, между SNP\_02 и SNP\_04, между SNP\_03 и SNP\_06, между SNP\_03 и SNP\_05 или предпочтительно между SNP\_03 и SNP\_04 в гетерозиготном или гомозиготном состоянии.

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

Еще один аспект настоящего изобретения относится к материалу для размножения растений дыни, содержащему фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, в котором фрагмент интрогрессии содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV растения-донора между SNP\_01 и SNP\_06, между SNP\_01 и SNP\_05, между SNP\_01 и SNP\_04, между SNP\_02 и SNP\_06, между SNP\_02 и SNP\_05, между SNP\_02 и SNP\_04, SNP\_03 и SNP\_06, между SNP\_03 и SNP\_05 или между SNP\_03 и SNP\_04. В предпочтительном варианте осуществления изобретения материал для размножения содержит фрагмент интрогрессии из хромосомы 5 устойчивого к ToLCNDV растения-донора, причем фрагмент интрогрессии содержит последовательность устойчивого к ToLCNDV растения-донора между SNP\_01 и SNP\_06, более предпочтительно между SNP\_01 и SNP\_05, еще более предпочтительно между SNP\_02 и SNP\_05, кроме того, предпочтительно между SNP\_02 и SNP\_04 и наиболее предпочтительно между SNP\_03 и SNP\_04.

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

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

Термин "материал для размножения" включает те компоненты растения, которые пригодны для получения потомства вегетативным (бесполом) или генеративным (половым) путем. Для вегетативного размножения могут использоваться, например, черенки, культуры ткани *in vitro*, клетки, протопласты, зародыши или каллусы, материал для микроклонального размножения, корневища или клубни. Прочий материал для размножения включает, например, плоды, семена, сеянцы, которые являются гомозиготными или гетерозиготными по фрагменту интрогрессии хромосомы 5, который придает устойчивость к ToLCNDV и т.д. В соответствии с одним аспектом материал для размножения представляет собой черенки, размножение которых осуществляется путем их прививки к другому корневищу или материалу тканевой культуры *in vitro*, в частности, к зародышевым культурам. Особенно предпочтительным является материал для размножения в виде материала для тканевых культур *in vitro*, в частности зародышевые культуры *in vitro*.

В соответствии с одним аспектом предоставляются не размножающиеся клетки растений, содержащие рекомбинантную хромосому 5, описанную в настоящем документе. В соответствии с одним аспектом, однако, такие не размножающиеся клетки растения могут быть частью растения дыни.

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

- a) отбор растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV;
- b) скрещивание растения-донора, отобранного на этапе a), с рекуррентным растением, не обладающим устойчивостью к ToLCNDV;
- c) получение семян из растений, полученных путем скрещивания на этапе b), и при необходимости;
- d) проверку того, обладают ли растения, выращенные из семян, полученных на этапе c), устойчивостью к ToLCNDV и/или содержат ли они один или несколько SNP из растения-донора, которые выбраны из группы SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 и SNP\_06.

На этапе а) способа получения устойчивого к ToLCNDV растения дыни по изобретению устойчивое к ToLCNDV растение-донор может быть отобрано путем заражения растений дыни ToLCNDV и определения уровня выраженности симптомов заражения ToLCNDV растения дыни в соответствии с описанием в настоящем документе. То же самое применимо для проверки на этапах б) и с) способа получения растений дыни, обладающих устойчивостью к ToLCNDV по настоящему изобретению, для подтверждения того, обладает ли растение устойчивостью к ToLCNDV или нет соответственно.

В предпочтительном варианте осуществления способа получения растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, по настоящему изобретению, растение-донор, обладающее устойчивостью к ToLCNDV, на этапе а) содержит фрагмент на хромосоме 5, придающий устойчивость к ToLCNDV, при этом такой фрагмент содержит последовательность растения-донора между SNP\_01 и SNP\_06, между SNP\_01 и SNP\_05, между SNP\_01 и SNP\_04, между SNP\_02 и SNP\_06, между SNP\_02 и SNP\_05, между SNP\_02 и SNP\_04, между SNP\_03 и SNP\_06, между SNP\_03 и SNP\_05 или между SNP\_03 и SNP\_04. Наиболее предпочтительно фрагмент на хромосоме 5, придающий устойчивость к ToLCNDV, содержит последовательность между SNP\_03 и SNP\_04. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения в способе получения растения дыни согласно изобретению, устойчивого к ToLCNDV, растение-донор, устойчивое к ToLCNDV, на этапе а) содержит фрагмент хромосомы 5, придающий устойчивость к ToLCNDV, содержащий последовательность между SNP\_01 и SNP\_06, между SNP\_01 и SNP\_05, между SNP\_01 и SNP\_04, между SNP\_02 и SNP\_06, между SNP\_02 и SNP\_05, между SNP\_02 и SNP\_04, между SNP\_03 и SNP\_06, между SNP\_03 и SNP\_05 или предпочтительно между SNP\_03 и SNP\_04, как обнаружено в семенах, хранящихся под NCIMB 42585.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения способ получения растения, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, по настоящему изобретению используют для получения растения по настоящему изобретению. Предпочтительные варианты осуществления и прочие варианты осуществления, описанные в настоящем документе для растений по изобретению, применимы соответственно к способу получения растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, по настоящему изобретению.

Растения, получаемые или полученные способом получения растений дыни, обладающих устойчивостью к ToLCNDV, по настоящему изобретению, также являются вариантом осуществления изобретения.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к способу получения семян дыни, включающему следующие этапы:

а) выращивание растения дыни, содержащего по меньшей мере одну хромосому 5 с фрагментом интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора между SNP\_03 и SNP\_04;

б) сбор плодов растений дыни, выращенных на этапе а);

с) сбор семян из плодов, полученных на этапе б).

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

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

Еще один вариант осуществления изобретения относится к способу получения гибридных семян дыни, который включает следующие этапы:

а) получение первого инбредного растения дыни, содержащего по меньшей мере одну хромосому 5 с фрагментом интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора между SNP\_03 и SNP\_04;

б) получение второго инбредного растения дыни, содержащего или не содержащего хромосому 5 с фрагментом интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора между SNP\_03 и SNP\_04;

с) скрещивание растения, полученного на этапе а), с растением, полученным на этапе б);

д) отбор семян, полученных в результате скрещивания на этапе с).

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

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

осуществления, описанные в настоящем документе для растений по изобретению, применимы соответственно к способу получения гибридного семени дыни по настоящему изобретению.

Гибридные семена, получаемые или полученные способом получения гибридных семян дыни по настоящему изобретению, также являются вариантом осуществления изобретения.

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

а) выращивание растения, содержащего по меньшей мере одну хромосому 5 с фрагментом интрогрессии из хромосомы 5 растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, при этом фрагмент интрогрессии содержит последовательность растения-донора между SNP\_03 и SNP\_04;

б) сбор плодов растений, выращенных на этапе а).

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

Плоды дыни, получаемые или полученные способом получения плодов дыни по настоящему изобретению, также являются вариантом осуществления изобретения.

Растения-доноры дыни, устойчивые к ToLCNDV, могут быть идентифицированы с помощью маркеров SNP, в частности одного или нескольких или всех из SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 и SNP\_06, которые описаны в настоящем документе. Таким образом, настоящим изобретением впервые обеспечивается возможность для специалиста в данной области идентифицировать растения-доноры, из которых фрагмент интрогрессии, придающий устойчивость растениям дыни к ToLCNDV, может быть перенесен в рекуррентные растения дыни.

Таким образом, еще один вариант осуществления изобретения относится к применению одного или нескольких или всех SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 или SNP\_06 для идентификации растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, или его частей (таких как клетки, плоды, листья). Предпочтительно применение относится к идентификации устойчивых к ToLCNDV растений-доноров дыни и/или рекуррентных растений дыни, а также к идентификации линий скрещивания, сортов или разновидностей, содержащих рекомбинантную хромосому 5, например рекомбинантную хромосому 5, полученную из семян, депонированных в соответствии с настоящим документом, которая при необходимости включает субфрагмент фрагмента интрогрессии, присутствующего в депонированных семенах.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к применению одного или нескольких или всех SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 или SNP\_06 для интрогрессии характеристики устойчивости к ToLCNDV в растение дыни, не обладающее устойчивостью к ToLCNDV, в частности в культурную линию или сорт дыни.

Кроме того, еще один вариант осуществления изобретения относится к применению одного или нескольких или всех SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 или SNP\_06 для выведения растений дыни, обладающих устойчивостью к ToLCNDV.

Также предоставляется способ скрининга растений или растительного материала или полученных из них ДНК на наличие фрагмента на хромосоме 5, придающего устойчивость к ToLCNDV. Данный способ включает следующие этапы:

скрининг геномной ДНК на генотип SNP одного или нескольких или всех SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 и SNP\_06; и

при необходимости отбор растений или растительного материала, которые содержат устойчивый донорный генотип одного или нескольких или всех SNP\_01, SNP\_02, SNP\_03, SNP\_04, SNP\_05 и SNP\_06.

Также предоставляется способ получения культурного растения *C. melo*, содержащего фрагмент интрогрессии на хромосоме 5, при этом указанный фрагмент интрогрессии содержит QTL ToLCNDV, при этом указанный способ включает следующие этапы:

скрещивание первого культурного растения дыни, чувствительного к ToLCNDV, со вторым, диким растением дыни, обладающим устойчивостью к ToLCNDV, при этом указанное второе растение дыни содержит CC или CT генотип для SNP\_01 в SEQ ID NO: 1, и/или TT или TG генотип для SNP\_02 в SEQ ID NO: 2, и/или TT или TC генотип для SNP\_03 в SEQ ID NO: 3, и/или AA или AG генотип для SNP\_04 в SEQ ID NO: 4, и/или CC или CT генотип для SNP\_05 в SEQ ID NO: 5, и/или AA или AG генотип для SNP\_06 в SEQ ID NO: 6;

сбор семян F1 растения, полученного в результате указанного скрещивания, и обратное скрещивание растения F1 с первым растением дыни для получения популяции обратного скрещивания (BC1) или самоопыление указанных растений F1 один или несколько раз для получения популяции F2 или F3 и при необходимости самоопыление популяции обратного скрещивания для получения популяции BC1S1,

при этом указанное F2, F3, BC1 или BC1S1 растение содержит CC или CT генотип для SNP\_01 в SEQ ID NO: 1, и/или TT или TG генотип для SNP\_02 в SEQ ID NO: 2, и/или TT или TC генотип для SNP\_03 в SEQ ID NO: 3, и/или AA или AG генотип для SNP\_04 в SEQ ID NO: 4, и/или CC или CT генотип для SNP\_05 в SEQ ID NO: 5, и/или AA или AG генотип для SNP\_06 в SEQ ID NO: 6.

Также предоставляется способ идентификации или определения культурного растения *C. melo*, содержащего фрагмент интрогрессии на хромосоме 5, при этом указанный фрагмент интрогрессии содер-

жит аллель, устойчивый к ToLCNDV, при этом указанный способ включает следующие этапы:

скрининг растения *Cucumis melo* с использованием анализа молекулярных маркеров, с помощью которого может осуществляться детекция по меньшей мере одного из маркеров SNP, выбранных из группы, состоящей из: SNP\_01 в SEQ ID NO: 1, SNP\_02 в SEQ ID NO: 2, SNP\_03 в SEQ ID NO: 3, SNP\_04 в SEQ ID NO: 4, SNP\_05 в SEQ ID NO: 5 и/или SNP\_06 в SEQ ID NO: 6; и

идентификацию и/или отбор растения, содержащего CC или CT генотип для SNP\_01 в SEQ ID NO: 1, и/или TT или TG генотип для SNP\_02 в SEQ ID NO: 2, и/или TT или TC генотип для SNP\_03 в SEQ ID NO: 3, и/или AA или AG генотип для SNP\_04 в SEQ ID NO: 4, и/или CC или CT генотип для SNP\_05 в SEQ ID NO: 5, и/или AA или AG генотип для SNP\_06 в SEQ ID NO: 6.

Предоставляется способ получения гибридных растений *C. melo* F1, содержащих фенотип устойчивости к ToLCNDV, при этом указанный способ включает следующие этапы:

скрещивание первого инбредного растения дыни, содержащего по меньшей мере одну рекомбинантную хромосому 5, при этом рекомбинантная хромосома 5 содержит фрагмент интрогрессии, который придает устойчивость к ToLCNDV первому инбредному растению дыни, когда он присутствует в гомозиготной или гетерозиготной форме, и при этом указанный фрагмент интрогрессии получен от дикого растения вида *Cucumis melo*, со вторым инбредным растением дыни, которое может содержать или не содержать указанную по меньшей мере одну рекомбинантную хромосому 5, и

сбор гибридных семян F1, полученных в результате указанного скрещивания.

Также настоящее изобретение включает способ получения растения дыни, которое включает устойчивость к ToLCNDV на хромосоме 5, включающий следующие этапы:

а) скрининг одного или нескольких диких образцов дыни с использованием анализа молекулярных маркеров, с помощью которого может осуществляться детекция по меньшей мере одного из маркеров SNP, выбранных из группы, состоящей из SNP\_01 в SEQ ID NO: 1, SNP\_02 в SEQ ID NO: 2, SNP\_03 в SEQ ID NO: 3, SNP\_04 в SEQ ID NO: 4, SNP\_05 в SEQ ID NO: 5 и/или SNP\_06 в SEQ ID NO: 6;

б) идентификацию и/или отбор дикого растения дыни, содержащего CC или CT генотип для SNP\_01 в SEQ ID NO: 1, и/или TT или TG генотип для SNP\_02 в SEQ ID NO: 2, и/или TT или TC генотип для SNP\_03 в SEQ ID NO: 3, и/или AA или AG генотип для SNP\_04 в SEQ ID NO: 4, и/или CC или CT генотип для SNP\_05 в SEQ ID NO: 5, и/или AA или AG генотип для SNP\_06 в SEQ ID NO: 6;

в) при необходимости подтверждение наличия характеристики устойчивости к ToLCNDV путем исследования устойчивости; и

г) при необходимости интродуцирование указанной устойчивости к ToLCNDV от указанного дикого образца в культурное растение дыни.

Предоставляется растение *Cucumis melo* или его часть, содержащее рекомбинантную хромосому 5, причем такая рекомбинантная хромосома 5 содержит фрагмент интрогрессии, который придает растению *Cucumis melo* устойчивость к ToLCNDV, когда он присутствует в гомозиготной или гетерозиготной форме, при этом указанный фрагмент интрогрессии содержит один, или несколько, или все маркеры одноядерного полиморфизма (SNP) из следующей группы: CC или CT генотип для SNP\_01 в SEQ ID NO: 1, TT или TG генотип для SNP\_02 в SEQ ID NO: 2, TT или TC генотип для SNP\_03 в SEQ ID NO: 3, AA или AG генотип для SNP\_04 в SEQ ID NO: 4, CC или CT генотип для SNP\_05 в SEQ ID NO: 5, и/или AA или AG генотип для SNP\_06 в SEQ ID NO: 6, при этом указанный фрагмент интрогрессии получен из дикого растения вида *Cucumis melo*, причем указанное дикое растение имеет средний индекс активности заболевания ToLCNDV по меньшей мере 7.0 по шкале от 1 = мертвое растение до 9 = отсутствие симптомов.

В соответствии с одним аспектом культурное растение дыни содержит по меньшей мере TT или TC генотип для SNP\_03 в SEQ ID NO: 3, и/или AA или AG генотип для SNP\_04 в SEQ ID NO: 4.

В соответствии с одним аспектом QTL придающий устойчивость к ToLCNDV или фрагмент интрогрессии, содержащий QTL, может быть получен из/присутствует в тех семенах, репрезентативный образец которых был депонирован под регистрационным номером NCIMB42585 или в их потомстве (вследствие чего потомство сохраняет признак устойчивости к ToLCNDV).

Информация о внесении семян в базу данных.

Репрезентативный образец семян культурной дыни, именуемый *Cucumis melo* TOLCHR5, содержащий фрагмент интрогрессии, придающий устойчивость к ToLCNDV, который интрогрессирован на хромосоме 5 (обратное скрещивание 4, поколение самоопыления 4, BC4S4), был депонирован компанией Nunhems B.V. 6 июня 2016 г. в NCIMB Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn Aberdeen, Шотландия, AB21 9YA, UK) согласно Будапештскому договору на основании экспертного решения (EPC 2000, Правило 32(1)). Семенам были присвоены следующие номера депонирования: NCIMB 42585.

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

В течение периода рассмотрения настоящей заявки доступ к внесенным в базу данных образцам будет предоставляться лицами, определяемым уполномоченным директором Патентного ведомства США,

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

Описание последовательностей.

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

R: G или A.

Y: T или C.

M: A или C.

K: G или T.

S: G или C.

W: A или T.

H: A, или C, или T.

B: G, или T, или C.

V: G, или C, или A.

D: G, или A, или T.

N: G, или A, или T, или C.

В SEQ ID NO: 1-6 нуклеотид SNP устойчивого донора обозначен жирным шрифтом и подчеркиванием.

SEQ ID NO: 1: последовательность растения-донора, устойчивого к ToLCNDV, содержащая SNP\_01.

SEQ ID NO: 1:

```
agctggtgca aagctggcat tcaaatcgaa tgaagaata gcagtacaag tgaagtcaat 60
tccactagat gaagtaatcc cggattcaga acgagtgctt ctaataaaaa tcatgttca 120
aggctgggaa tatcatgtgc taaaaggggc aaagagaatt ttgtcaagga agggcactga 180
agctccatat ctcatctatg 200
```

SEQ ID NO: 2: последовательность растения-донора, устойчивого к ToLCNDV, содержащая SNP\_02.

SEQ ID NO: 2:

```
ttgtaatcat ggccattgcc tgategacg aatgtggcgt ctgattggg cacggctctg 60
atgaagttac tccaaagctt gtggaagtta atgggtctt ctctccacr tctgrtctcc 120
ttccactcga caatgtggtt tcttctcaa acacaaaaga aaccctggt gaagctgtag 180
aagaaagctg tgagttctt tctccactca gttctaggti tagttttta ttgtttttt 240
tttctttt tctttttac ttgctttgag ctgtaggaca caacacaaaa tgataagaac 300
aaaaatcaat ctatgttatt gttgcattg tctcgcctgc ctctcaagg taactaggct 360
ataacactga tccaaaatgt ataacttta ttgctaagta acttatattg caagattgg 420
gatggaatag gagcataggt tgcactaat agttttgtcc aactttggtt atagttcag 480
ccagttggtt cagatgaaat tcttagtat taccactaat ggaattggtt ttataaatgt 540
tgtaggtggt gaaagaagtg aagaatatga aaaggaaagc aggggaaccg agaaggctga 600
aatctaccg acaaaagcaa catctgaagc aggttctgaa gtccaacctg ttccagtga 660
ttctgctcag atggtaccga atatgttggg gctcgggtgat gcttataagc tagctgtagg 720
tgctagagga ggaagacaat tgtctggcaa gcttttgaa caatggatyg ggaaggaatc 780
ttcaaaagtt agtgaagatc tgaagcttct ctgacacaa ctctcattta atcgttttaa 840
tgaccaatca cgggagatga gtccaaggct gtccgtaaat ggagacgagg tgaggaaact 900
```

tgattacttg agygcctgtg ggatgcaaat gctacaaaa aggwtttcgc tgaagaaga 960  
 tgagtcgggt gtagaatctt tagatggaag cataattagt gaaatcgatg gggaaaacat 1020  
 ggctgatagg tgaaacgac agattgagta tgataagaag gttmtgartt cttataca 1080  
 ggaattggag gaagaagaa atgcatccgc aattgctgca aatcaggcaa tggccatgat 1140  
 taca 1145

SEQ ID NO: 3: последовательность растения-донора, устойчивого к ToLCNDV, содержащая SNP\_03.

SEQ ID NO: 3:

agacggcgta catgcagcat tctgttacc cgcgatgcc agcgatgaaa саactcctt 60  
 gcatccttat ggtccagagg ttccagatca tacgactcac саaatgcagg ааacttaat 120  
 ctagaggтга ссааааттt gcagtgggt aatcgggaga actttca 168

SEQ ID NO: 4: последовательность растения-донора, устойчивого к ToLCNDV, содержащая SNP\_04.

SEQ ID NO: 4:

ggagkcttca tccgtcttta ccttctcac tttttacct аасаагтга сgtctgtag 60  
 gttgcaagat аасаааттg gatttcttag аасааттg ttatgtgcc ccttcrtga 120  
 ааgагтгга сttgtccgaa аасаacttt gtagamtacc ctctgtatt атааттта 180  
 аатссггaa атаctttat асаатггггt gtgagttgct ygaagaatt tcaagggtc 240  
 саgаагггt ааттгtag агtcccag gatgcaaac attggctaga ttccccgaca 300  
 attgactga ttcatatct tgggтаат ctgсggгсg taccatctct cttctcatg 360  
 acttccat tctctagc tcatgtat tтааттсат tcatataa tatattact 420  
 атаactatt actgatctca tggгсagga atgtgтаа ggtggatg 468

SEQ ID NO: 5: последовательность растения-донора, устойчивого к ToLCNDV, содержащая SNP\_05.

SEQ ID NO: 5:

tcaggtagt сааасаатt gataatatt gctcaccatc аааатггга accatagaca 60  
 tagaytgacc ааgсссaggc аааacggcat catcttttg tttctatca ttactattct 120  
 gattaccсаа ааgааатсt cttttgtac ttggagagaa атаатсссг tctgcacatt 180  
 gcatggaagg tgtgctgtca tgagcatcag cattacacac accagaatta gatttctgc 240  
 tagccaagat ttcaсааса ссааgаgааg сaggactac gcctggggtc tctgctyag 300  
 аааgссааg аtсаааgсac acttgгaаg gacctgaaac tgtctcagat ссagggattt 360  
 ctctacatt gggтааgсta gcctgtcaa агссатсаса саcatctaca агсggсagtc 420  
 taccatac ggaactata gaataagcag gctattttc атааасаса tтаacгctg 480  
 cattgggatt агtтааacat ggcatcaaat gggааgаatc ссgааатсt ааgctgttct 540  
 cattggaccg сagсactcca gaattcaagt ctctgacca tactttttt tgcctgctat 600  
 саacagтааа атттgagct ttaccatct cacagtcaag tggctcatt сgagagttac 660  
 gcttctct cattaaatca cktacagaac ggccttccct ggagtattgt gtgctgtac 720  
 ctgcatttc таатгтааса tccacctgcc ctccatctc actgaaaag саactaatga 780  
 actcagaatc ttggtcгаа сttgtccata tgtcaggcct gсааgааттg асасacггс 840  
 аатсггatt саctttctca gcctcatgaa аaggтаага tccccааат gatttctct 900  
 tctgtgact gсааgаacct gaatcaatgc catgcaataa tattgcaagt ttggaagatc 960  
 ttcatctc ааcаттаага tctctacag gtgagtttc агtcgaccct ссаgааgааg 1020  
 аgасаатat атсгсакgt агсcagt 1047

SEQ ID NO: 6: последовательность растения-донора, устойчивого к ToLCNDV, содержащая SNP\_06.

SEQ ID NO: 6:

cgcctacmtgc aggcaaaaga tggcacagta cagtaatggt agctcatctg ttcatacagg 60  
 aagaatcaagc tgcctcagcc attcagatc ggttccaccc ctgatcatc cctacaatga 120  
 tcgcatctgt cctctccttg atgctgttga caagctctgt cacctcatga tcatgagaga 180  
 aggcaccaa ctgcctacca tagttgtgt tggatgacag tcawccggta agtcaagtgt 240  
 cctcgagtcg ttgctggga tcagcctacc tcgaggtcag ggcactgca ccagggtccc 300  
 tctgataatg aggtccaaa accatcctga tcccgaacc gagctgttt tggagtaca 360  
 tgggaaaaag atccacaccg acgaatcctt cattgctgaa gacatctgta cagctacaga 420  
 ggagattgct ggcagtgcca aaggatatac gaaagcgcca tggacttga ttgtgaagaa 480  
 aatggtgtt cctgatctta caatggttga tctcctgga attacragag tgcctgttaa 540  
 agatcagcct gaagacattt atgaccaaat aaaagatata atcatggaac atatcaagcc 600  
 agaagagagc atcatcttga atgtctgtc tgcgacggtt gatitccaa cttgtgaatc 660  
 gatacggatg tctcaaaagt tcgacaagac gggaatgaga acgttggcag ttgtgactaa 720  
 gctgacaag gcaccagaag gcctacacga gaaggtcacc rcggatgatg tcagatcgg 780  
 ccttggttat gtttgcgta ggaaccgaat tggcaatgag acatatgagg aagctcgggt 840  
 tgcagaagcc aattgtttt caactcatcc tcttctccc aaaattgaca aatctgtgt 900  
 gggcatcca gtcttgctc agaagttggt gcaaatcaa gcaggtaccc aaactaatc 960  
 ctgactcaa agctagggtc cgtagataa ccaattgtt ttagaaaatc aagttattt 1020  
 tctctaaatm gtgtaccatg atttcatct tcttaataa aaaaagttgm attcttwaact 1080  
 aattttaa agcaaaaaca agtttaata cttttt 1118

SEQ ID NO: 7: праймер аллель-специфической ПЦР (KASP) для аллеля FAM SNP\_01.

SEQ ID NO: 8: праймер для VIC аллеля SNP\_01 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 9: общий праймер для SNP\_01 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 10: праймер для FAM аллеля SNP\_02 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 11: праймер для VIC аллеля SNP\_02 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 12: общий праймер для SNP\_02 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 13: праймер для FAM аллеля SNP\_03 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 14: праймер для VIC аллеля SNP\_03 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 15: общий праймер для SNP\_03 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 16: праймер для FAM аллеля SNP\_04 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 17: праймер для VIC аллеля SNP\_04 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 18: общий праймер для SNP\_04 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 19: праймер для FAM аллеля SNP\_05 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 20: праймер для VIC аллеля SNP\_05 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 21: общий праймер для SNP\_05 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 22: праймер для FAM аллеля SNP\_06 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 23: праймер для VIC аллеля SNP\_06 KASP-анализа.

SEQ ID NO: 24: общий праймер для SNP\_06 KASP-анализа.

#### Описание чертежей

Фиг. 1. Показано рекуррентное растение, чувствительное к ToLCNDV (верхняя фигура), и рекуррентное растение, которому была придана устойчивость к ToLCNDV (нижняя фигура) путем интрогрессии фрагмента, содержащего донорную последовательность между SNP\_01 и SNP\_06. Снимок был сделан через 25 дней после заражения (дпз) ToLCNDV с помощью белокрылки.

Фиг. 2. Показаны уровни выраженности симптомов через 35 дней после заражения (дпз) ToLCNDV путем передачи от белокрылки растения-донора, устойчивого к ToLCNDV (дикий донор), рекуррентного растения (рекуррентное растение) и растения, полученного после интрогрессии фрагмента, придающего устойчивость к ToLCNDV, рекуррентному растению от растения-донора (интрогрессия). Уровни выраженности симптомов определяли в соответствии с описанием в настоящем документе, в разделе "Общие методы".

#### Общие методы

1. Определение уровня выраженности симптомов у растений, инфицированных ToLCNDV.

1.1. Растения и патогены (вирус).

Для заражения растений дыни используется штамм ToLCNDV, инфицирующий растения дыни (Cu-

cumis melo). В настоящем изобретении в качестве инокулята использовали штамм ToLCNDV, выделенный в Мурсии, Испания.

#### 1.2. Распространение ToLCNDV.

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

#### 1.3. Инокуляция исследуемых растений.

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

#### 1.4. Выращивание инфицированных исследуемых растений.

Инфицированные исследуемые растения, полученные в соответствии с описанием в п.1.3, пересадили в горшки большего размера и перенесли в теплицу с охлаждающим оборудованием. Растения выращивали при температуре приблизительно 18°C ночью и приблизительно 25°C днем со световым периодом 14-16 ч. Инфицированные растения для каждого инфицированного генотипа выращивали в двух повторных опытах на двух разных участках, на каждом из которых было размещено 6 растений, инфицированных ToLCNDV и одно ложно инфицированное растение. Участки были рандомизированы в отношении площади выращивания.

1.5. Оценка уровня выраженности симптомов инфекции ToLCNDV Оценка уровня выраженности симптомов может осуществляться уже приблизительно через 15 дней после заражения (дпз) ToLCNDV, но предпочтительно производится приблизительно через 30 дней после заражения (дпз) ToLCNDV или позже. В случае если имеются растения, демонстрирующие выздоровление от вирусной инфекции, дальнейшую оценку симптома проводят приблизительно через 45 дней после заражения (дпз) ToLCNDV.

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

Уровень выраженности симптомов	Наблюдаемый фенотип
1	Мертвое растение
2	Чрезвычайно сильная мозаичность и свертывание листа, хлороз и снижение роста. Растение не может выздороветь.
3	Сильная мозаичность и свертывание листа, хлороз и снижение роста. Растение не может выздороветь.
4	Свертывание и мозаичность, хлороз, наблюдается незначительное снижение роста, или снижение роста не наблюдается. Растение не может выздороветь.
5	Свертывание и мозаичность, хлороз, снижение роста не наблюдается. Наблюдается незначительное выздоровление верхней части растения
6	Незначительное свертывание, мозаичность и хлороз, снижение роста не наблюдается. Наблюдается выздоровление верхней и средней части растения
7	Незначительное свертывание, мозаичность и хлороз, снижение роста не наблюдается. Симптомы наблюдаются лишь в нижней части растения
8	Слабая мозаичность
9	Отсутствие симптомов

#### 1.6. Дополнительные исследования, проводимые при необходимости.

Рекомендуется использовать по меньшей мере один генотип с высокой степенью устойчивости к ToLCNDV (уровень симптомов 8-9) и один генотип с высокой степенью чувствительности к ToLCNDV (уровень симптомов 1) в каждой экспериментальной модели. Кроме того, в каждую экспериментальную модель рекомендуется также включать генотип, являющийся промежуточно устойчивым к инфекции ToLCNDV. Наилучшие результаты достигаются, когда включены упомянутые генотипы, а уровни выраженности симптомов каждого генотипа оцениваются относительно результатов, полученных для генотипов с высокой устойчивостью, высокой чувствительностью и промежуточной устойчивостью. Эти генотипы также дают четкое указание на степень заражения ToLCNDV растений дыни белокрылками.

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

#### Примеры

##### 1. Отбор растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV.

Проводилось исследование уровня выраженности симптомов для диких образцов дыни проверяли на устойчивость к ToLCNDV в соответствии с исследованием, описанным в разделе "Общие методы". Было идентифицировано дикое донорское растение, обладающее высокой устойчивостью к ToLCNDV и имеющее уровень устойчивости около 7 (как будет показано ниже, средний индекс активности заболевания составляет 7.4, в то время как восприимчивое растение имеет средний индекс активности заболевания 2.0).

##### 2. Идентификация геномного местоположения устойчивости к ToLCNDV.

Были разработаны три популяции картирования, включая использование растения-донора, полученного в примере 1, для картирования положения фрагмента, придающего устойчивость к ToLCNDV (QTL), в геноме растения-донора дыни.

Анализ в этих картографических популяциях выявил один основной QTL, связанный с устойчивостью, расположенный на хромосоме 5 и показывающий доминантные паттерны наследования.

Величина обнаруженного фрагмента QTL и наблюдаемые закономерности наследования предполагают наличие одного локуса доминантного гена. Из устойчивого материала авторами изобретения были разработаны линии BC (обратное скрещивание) для точного картирования и дальнейшего исследования устойчивости, полученной от донора. Генотипические результаты в 10 продвинутых семействах BC, разработанных посредством фенотипического отбора, показали >93% соответствия с отдельными фенотипами.

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

SNP	Идентификационный номер маркера	Положение	Координаты
		SNP	псевдомолекулы
	AI_13-H12	CM3.5_scaffold00003	7996720 27276249
SNP_01	mME11320_k	CM3.5_scaffold00003	7824960
SNP_02	mME43070_k	CM3.5_scaffold00003	6950286
SNP_03	mME10621_k	CM3.5_scaffold00003	6553350
SNP_04	mME50729_k	CM3.5_scaffold00003	5785550
SNP_05	mME32395_k	CM3.5_scaffold00003	5202092
	CMGAAN144	CM3.5_scaffold00003	5123876 24403405
	CMPSNP682	CM3.5_scaffold00009	4703882 15854444
SNP_06	mME49184_k	CM3.5_scaffold00009	2607437
	CMPSNP460	CM3.5_scaffold00009	1816109 12966671

### 3. Разработка KASP-анализа.

Для выявления SNP, фланкирующих QTL, был разработан KASP-анализ. SNP, связанные с QTL, могут быть определены с использованием следующих праймеров в KASP-анализе.

SNP	FAM аллель	VIC аллель	Общий Праймер
SNP_01	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
SNP_02	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
SNP_03	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
SNP_04	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
SNP_05	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
SNP_06	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24

### 4. Интрогрессия ToLCNDV в культурное растение дыни.

Осуществляли обратное скрещивание с культурными растениями дыни и получены рекуррентные растения дыни, обладающие повышенной устойчивостью к ToLCNDV. Присутствие QTL в этих линиях было установлено с использованием последовательностей KASP-анализа, показанных в примере 3. Репрезентативный результат для уровня выраженности симптомов ToLCNDV, полученного для этих растений, представлен в следующей таблице и на фиг. 2. Уровни выраженности симптомов определяли через 35 дней после заражения (дпз) в соответствии с методом, описанным в настоящем документе в разделе "Общие методы".

	СЗДИГ	СО
Дикий донор	7.40	2.07
Рекуррентное растение	2.00	0.00
Интрогрессия	5.11	1.45

СЗДИГ: среднее значение для исследуемого генотипа;  
СО: среднее отклонение.

Дополнительное обратное скрещивание сделано для введения устойчивости в элитные сорта Пель де сапо, Галия, Канталупа и Шаранта. Генотипические результаты в 10 продвинутых семействах ВС, разработанных посредством фенотипического отбора, проявляют >93% соответствия с отдельными фенотипами.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Клетка растения дыни, содержащая фрагмент интрогрессии на хромосоме 5 из растения-донора, обладающего устойчивостью к вирусу курчавости листьев томата Нью-Дели (ToLCNDV), отличающаяся тем, что фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV и содержит тимин в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 и/или аденин в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4, где фрагмент интрогрессии получают из семян, депонированных под номером доступа NCIMB 42585.

2. Растение дыни, обладающее устойчивостью к ToLCNDV, содержащее клетки растения дыни по п.1.

3. Семя дыни, содержащее клетки растения по п.1.

4. Плод дыни, содержащий клетки растения по п.1.

5. Материал для размножения растения дыни, содержащий клетки растения по п.1, причем материал для размножения выбран из черенков или материала тканевой культуры *in vitro*.

6. Способ получения растения дыни, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, включающий следующие этапы:

а) отбор растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, содержащего фрагмент на хромосоме 5, где фрагмент придает устойчивость к ToLCNDV и содержит тимин в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 и/или аденин в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4 и где фрагмент получают из семян, депонированных под номером доступа NCIMB 42585;

б) скрещивание растения-донора, отобранного на этапе а), с растением, не обладающим устойчивостью к ToLCNDV;

с) получение семян из растений, полученных путем скрещивания на этапе б); и

д) проверка того, обладают ли растения, выращенные из семян, полученных на этапе с), устойчивостью к ToLCNDV и содержат ли они тимин в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 и/или аденин в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4.

7. Способ получения семян дыни, включающий следующие этапы:

а) выращивание растения дыни, содержащего по меньшей мере одну хромосому 5 с фрагментом интрогрессии на хромосоме 5 из растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, причем фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV и содержит тимин в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 и/или аденин в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4, где фрагмент интрогрессии получают из семян, депонированных под номером доступа NCIMB 42585;

б) сбор плодов растений дыни, выращенных на этапе а); и

с) сбор семян из плодов, полученных на этапе б).

8. Способ получения гибридных семян дыни, включающий следующие этапы:

а) получение первого инбредного растения дыни, содержащего по меньшей мере одну хромосому 5 с фрагментом интрогрессии на хромосоме 5 из растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, причем фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV и содержит тимин в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 и/или аденин в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4, где фрагмент интрогрессии получают из семян, депонированных под номером доступа NCIMB 42585;

б) получение второго инбредного растения дыни, содержащего или не содержащего хромосому 5 с фрагментом интрогрессии на хромосоме 5 из растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, причем фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV и содержит тимин в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 и/или аденин в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4, где фрагмент интрогрессии получают из семян, депонированных под номером доступа NCIMB 42585;

с) скрещивание растения, полученного на этапе а), с растением, полученным на этапе б); и

д) отбор семян, полученных в результате скрещивания на этапе с).

9. Способ получения плода дыни, включающий следующие этапы:

а) выращивание растения, содержащего по меньшей мере одну хромосому 5 с фрагментом интрогрессии на хромосоме 5 из растения-донора, обладающего устойчивостью к ToLCNDV, причем фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV и содержит тимин в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 и/или аденин в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4, где фрагмент интрогрессии получают из семян, депонированных под номером доступа NCIMB 42585;

б) сбор плодов растений, выращенных на этапе а).

10. Способ скрининга растений, или растительного материала, или полученных из них ДНК на наличие фрагмента интрогрессии на хромосоме 5, придающего устойчивость к ToLCNDV, причем фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV и содержит тимин в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 и/или аденин в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4, где фрагмент интрогрессии получают из семян, депонированных под номером доступа NCIMB 42585, при этом способ включает следующие этапы:

скрининг геномной ДНК на генотип SNP одного, или нескольких, или всех SNP\_03 в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 и SNP\_04 в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4; и

отбор растений или растительного материала, которые содержат ТТ или ТС генотип для SNP\_03 в SEQ ID NO: 3 и/или АА или АГ генотип для SNP\_04 в SEQ ID NO: 4.

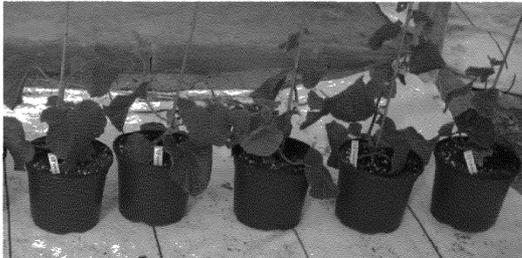
11. Способ идентификации или определения культурного растения *C. melo*, содержащего фрагмент интрогрессии на хромосоме 5, где указанный фрагмент интрогрессии содержит аллель, устойчивый к ToLCNDV, причем фрагмент интрогрессии придает устойчивость к ToLCNDV и содержит тимин в нуклеотиде 68 SEQ ID NO: 3 и/или аденин в нуклеотиде 227 SEQ ID NO: 4, где фрагмент интрогрессии получают из семян, депонированных под номером доступа NCIMB 42585, при этом способ включает следующие этапы:

скрининг растения *Cucumis melo* с использованием анализа молекулярных маркеров, детектирующего по меньшей мере один из маркеров SNP, выбранных из группы, состоящей из SNP\_03 в SEQ ID NO: 3 и SNP\_04 в SEQ ID NO: 4; и

идентификация и/или отбор растения, содержащего ТТ или ТС генотип для SNP\_03 в SEQ ID NO: 3 и/или АА или АГ генотип для SNP\_04 в SEQ ID NO: 4.



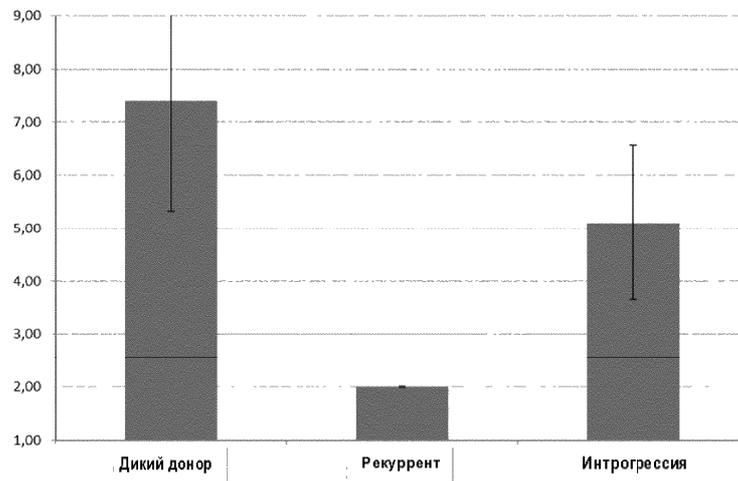
ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ  
РЕКУРРЕНТ



ИНТРОГРЕССИРОВАННАЯ  
УСТОЙЧИВОСТЬ

Фиг. 1

Шкала заболевания от 1 до 9 через 35 дпз



Фиг. 2

