



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 228**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06835672 .4**
96 Fecha de presentación : **21.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1962578**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **Plantas de melones resistentes a closterovirus.**

30 Prioridad: **21.12.2005 EP 05077953**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.10.2011

73 Titular/es: **MONSANTO INVEST N.V.**
Handelsweg 53 N
1181 ZA Amstelveen, NL

72 Inventor/es: **Hofstede, René, Johannes, Maria;**
Kraakman, Petrus, Jacobus y
De Vries, Jeroen, Sebastiaan

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Plantas de melones resistentes a closterovirus

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al fitomejoramiento y a la biología molecular. Más específicamente, la presente invención se refiere a una planta de melón resistente a closterovirus que comprende un locus de un carácter cuantitativo (QTL) asociado con la resistencia a closterovirus en melón.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El virus del trastorno del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV) es un closterovirus transmitido en la naturaleza por la mosca blanca *Bernisia tabaci*. El CYSDV se detectó por primera vez en 1982 en los Emiratos Árabes Unidos y, desde entonces, se ha hallado en España, Portugal, Marruecos, Líbano y América del Norte afectando de manera amplia a las cosechas de cucurbitáceas. El CYSDV induce manchas cloróticas intervenales en hojas maduras que pueden engrandecerse y finalmente fusionarse produciendo un amarilleo de toda la hoja, a excepción de las venas que permanecen verdes. Los síntomas del amarilleo van acompañadas de una reducción sustancial de la producción y la calidad de los frutos y, por tanto, el virus presenta una importancia económica elevada.

El control del CYSDV se basa actualmente en tratamientos químicos contra su vector y prácticas de cultivo preventivo, ambas con un éxito limitado. La utilización de cultivos resistentes genéticamente es una buena opción para el control del CYSDV.

Recientemente (López-Sesé y otros, 2000) se han hallado los números de acceso resistentes de melón (*Cucumis melo*), tal como el número de acceso C-105 (TGR-1551). En principio, el material genético de dichos números de acceso que comprende la información genética responsable de la resistencia a CYSDV se podría introgresar en cultivos comerciales. Sin embargo, por razones desconocidas, estos intentos no han sido satisfactorios hasta la fecha. Por lo tanto, actualmente no existe comercialmente ningún cultivo de melón resistente. Se cree que el problema práctico de desarrollar cultivos resistentes se ve obstaculizado por dos factores. En primer lugar, no se sabe si dicho número de acceso específico C-105 proporciona la mejor fuente de resistencia. Si el resultado es un cultivo que muestra una resistencia parcial, el resultado de la introducción en el mercado de dicho cultivo puede conducir al desarrollo de cepas virales que rompan la resistencia. Además, la posibilidad de fijar de manera estable la característica de la resistencia en el genoma de la planta diana sigue sin determinarse. De este modo, la elección de una fuente particular de resistencia no garantiza el éxito e incluso puede presentar varios riesgos. Además, la propia introducción implica un esfuerzo de cultivo sustancial e incluye el desarrollo y la realización de bioensayos para conseguir plantas hijas resistentes. En realidad, el desarrollo de un cultivo resistente es comercialmente costoso de realizar y cualquier programa se puede abandonar prematuramente cuando no se consiguen resultados rápidamente.

A efectos de reducir las dudas y el trabajo implicado en el desarrollo de un cultivo resistente, sería beneficioso tener un marcador genómico simple para la característica de resistencia. A continuación, dicho marcador se podría utilizar en procedimientos de selección asistida de marcadores (MAS) como parte de un programa dedicado de mejoramiento. Si dicho marcador se puede hallar se determina parcialmente mediante la estructura genómica de la característica de resistencia. Si la característica es multigénica, no es probable que se halle un único marcador que se pueda utilizar de manera fiable en los procedimientos MAS. Además, el desarrollo del propio marcador o marcadores supone un aumento significativo del trabajo, posiblemente eclipsando los costes y el tiempo implicados en un programa de mejoramiento simple.

Sin embargo, una vez que se identifica una fuente de resistencia adecuada y se desarrolla un marcador, se pueden rastrear nuevas plantas resistentes, lo cual aumenta su valor comercial.

55 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en un primer aspecto a una planta de la especie de *Cucumis melo*, comprendiendo dicha planta un elemento genético derivado de una planta de la especie *Cucumis melo* de variedad *agrestis*, cuyo elemento genético comprende un QTL que confiere resistencia a closterovirus o una parte del mismo que confiere resistencia al closterovirus unido a, como mínimo, un marcador localizado en el cromosoma equivalente a un grupo de unión (LG) 6 de número de acceso de melón PI 313970, tal como se define posteriormente en la reivindicación 8. Se sabe que los números de acceso salvajes de las plantas de *Cucumis melo* que son resistentes a closterovirus aparecen en la naturaleza (por ejemplo, el número de acceso de melón C105, véase más arriba). Sin embargo, las plantas de melón de la especie *Cucumis melo* de variedad *agrestes*, por ejemplo, tal como el número de acceso PI313970), no se asociaron previamente con la resistencia a closterovirus. Los presentes inventores han encontrado ahora que la resistencia en esta variedad está relacionada con una región genética o QTL definido (de aquí en adelante también indicado como QTL-1). Una planta de melón de la presente invención comprende un elemento

genético derivado de una planta de la especie *Cucumis melo* de variedad *agrestis*, en particular de número de acceso de melón PI313970, cuyo elemento genético comprende el QTL que confiere resistencia a closterovirus identificado por los presentes inventores.

Una planta de la presente invención es preferentemente un cultivo de *Cucumis melo*, pero no está limitado necesariamente a una cepa especial. Una planta de la presente invención es preferentemente una planta de *Cucumis melo* que presenta características comercialmente valiosas, incluyendo, pero sin limitarse a la misma, plantas de melón que presentan características de fruta o semilla comercialmente valiosas.

Dicha planta de la presente invención comprende el QTL referido, tal como se define en las reivindicaciones, en una forma en la que los genes de resistencia están presentes en ambos alelos. De este modo, las plantas de la presente invención son homocigóticas para la característica de resistencia. Debe indicarse en este aspecto que aunque las plantas heterocigóticas no expresan una característica recesiva, las nuevas plantas que comprenden el QTL, o genes que confieren resistencia a closterovirus comprendidos en el mismo, en forma heterocigótica constituyen un producto intermedio importante en un programa para desarrollar un cultivo resistente.

El QTL que confiere resistencia a closterovirus de la presente invención (QTL-1) se asocia preferentemente con un marcador que se localiza en un cromosoma equivalente del grupo de unión (LG) 6 y tramos desde la posición 25,5 cM a 29,1 cM, preferentemente aproximadamente en la posición 28,6 cM en el mapa presentado en la figura 1. La región en la que se localiza el QTL está unida al marcador E11/M49-239.

Una planta resistente a closterovirus de la especie *Cucumis melo* puede ser cualquier especie de *Cucumis melo* con la condición de que la planta no sea el número de acceso de melón PI313970. De este modo, en una planta de la presente invención, el QTL que confiere resistencia a closterovirus, tal como se definen en la presente invención, no está en su base genética natural del número de acceso de melón PI313970. En otra realización preferente, una planta de la presente invención no es una planta de la especie *Cucumis melo* de variedad *agrestis*. En otra realización preferente, una planta de la presente invención es cultivo de melón.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una parte de una planta de la presente invención, tal como una semilla.

En la presente invención se describe un locus de un carácter cuantitativo (QTL) asociado con la resistencia a closterovirus en una planta de melón de número de acceso PI313970. El QTL-1 que confiere resistencia a closterovirus está asociado con los marcadores E11/M54-156 (cis), E14/M54-152 (cis), E14/M51-210 (cis), E14/M51-083 (trans), E11/M49-239 (cis), E11/M64-169 (cis), E14/M60-262 (trans), E11/M67-278 (cis), E11/M64-163 (cis) y/o E11/M49-072 (trans), más preferentemente con el marcador E11/M49-239, y se localiza en el cromosoma equivalente del grupo de unión (LG) 6 y los tramos desde la posición 25,5 cM a 29,1 cM. Como entidad física, el QTL-1 es parte de un ácido nucleico, ya sea aislado o en una base genómica, y es capaz de conferir resistencia a closterovirus a una planta en el genoma donde se introduce, preferentemente, en una localización del genoma que es homóloga a la localización en genoma del número de acceso de melón PI313970 donde se detectó por primera vez y tal como se especifica en la presente invención.

Los propios marcadores se pueden utilizar en aspectos relacionados con la selección asistida de marcadores y métodos en los se rastrean plantas que tienen el QTL. Los marcadores utilizados en dichos aspectos pueden ser marcadores trans o cis. Un marcador trans indica un polimorfismo resultante de la introgresión de ADN exógeno (donante) en el genoma receptor de la planta, cuyo polimorfismo está unido en cis con el genoma receptor, es decir, unido con el alelo opuesto. De este modo, los marcadores cis se unen con el alelo de interés (es decir, del donante), mientras que los marcadores trans se unen con el alelo opuesto (es decir, del receptor). Sin embargo, ambos son predictivos para el alelo resistente codificado por el QTL de interés.

En la presente invención también se describe un método para producir una planta de la presente invención que comprende introducir en una planta de melón susceptible de closterovirus un elemento genético derivado de una planta de la especie *Cucumis melo* de variedad *agrestis*, más preferentemente del número de acceso de melón PI313970, cuyo elemento genético comprende el QTL que confiere resistencia a closterovirus tal como se describió con más detalle anteriormente.

La introducción del QTL, o un ácido nucleico aislado que comprende el QTL descrito en la presente invención o una parte del mismo que confiere resistencia, en una planta de melón se puede realizar mediante cualquier método conocido por un técnico. Preferentemente, la introducción se realiza mediante introgresión (cruzamiento). Dicho método comprende la etapa de cruzar una planta de melón de número de acceso PI313970, o un derivado del mismo resistente a closterovirus, con una planta de melón susceptible a closterovirus; recoger la semilla del cruzamiento; crecer dicha semilla para producir plantas de progenie F1; autocruzamiento o retrocruzamiento de dichas plantas de progenie F1 con el donante o receptor parental para producir semillas F2; crecer dichas semillas F2 para producir plantas de progenie F2; determinar la presencia en el genoma de, como mínimo, una de dichas plantas de progenie F2 de un QTL que confiere resistencia a closterovirus, en el que dicho QTL se caracteriza tal como se ha descrito con más detalle anteriormente, en el que la presencia de dicho QTL se confirma mediante la

detección de la presencia en el ADN de dicha, como mínimo, una planta de progenie F2 de un marcador unido a dicho QTL.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA FIGURA

La figura 1 representa un mapa de uniones que indica la posición relativa de los diversos marcadores descritos en la presente invención. Las posiciones relativas en el grupo de unión 6 (LG-VI) se proporcionan en cM. Sólo se indican los marcadores con posiciones conocidas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El término "melón" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a la especie *Cucumis melo* L. (sinónimos *Cucumis chito*; *Cucumis dudaim aegyptiacus*; *Cucumis flexuosus*; *Cucumis melo* variedad *acidulus*; *Cucumis melo* variedad *aegyptiacus*; *Cucumis melo* variedad *ameri*; *Cucumis melo* variedad *duripulposus*; *Cucumis melo* variedad *hibernus*; *Cucumis melo* variedad *makuwa*; *Cucumis melo* variedad *microspermus*; *Cucumis microspermus*; *Cucumis momordica*) e incluye números de acceso salvajes, así como cultivos salvajes. A veces se considera que *Cucumis melo* consiste en las subespecies *Cucumis melo* subespecie. *agrestis* y *Cucumis melo* subespecie *melo*. Éste último se puede subdividir también en las variedades botánicas variedad *cantalupensis* (también conocida como cantalupo; melón almizclero; melón enrejado ("netted melon"); melón persa; melón nuez moscada ("nutmeg melon"), variedad *chito*, variedad *flexuosus*, variedad *inodorus*, variedad *momordica* ("snap melon"), variedad *reticulatis* y variedad *texanus*. El número de acceso de melón PI313970, tal como se refiere en la presente invención, corresponde a *Cucumis melo* variedad *agrestis*. Esta variedad botánica crece como maleza en varios países africanos y asiáticos. Este número de acceso presenta el estado biológico "salvaje". Su fruto no es comestible.

El término "cultivo" se utiliza en la presente invención para indicar una planta que presenta un estado biológico diferente al estado "salvaje", el cual indica el estado original no cultivado o natural de una planta o número de acceso. El término "cultivo" (para una variedad cultivada) incluye, pero sin limitarse a las mismas, semisalvaje, maleza, cultivo tradicional, criollo, material de cultivo, material de investigación, línea de cultivo, población sintética, híbrida, población base/ de reserva fundadora, línea cosanguínea (planta parental de un cultivo híbrido), población de segregación, reserva mutante/genética, y cultivos avanzados/mejorados. Entre los ejemplos de cultivos se incluyen variedades de cultivo que pertenecen a los grupos botánicos *Cucumis melo* variedad *cantalupensis* (el grupo cantalupo de Charantais e italiano), *Cucumis melo* variedad *reticulatis* (los grupos Galia y Ananas), y *Cucumis melo* variedad *inodorus* (incluyendo los tipos Piel de Sapo, Canario Amarillo, Branco y melón dulce). Por lo tanto, una planta de la presente invención es preferentemente una planta de las variedades botánicas de melón *cantalupensis*, *reticulatis* o *inodorus*. El término "variedad" indica *varietas* (un nivel taxonómico por debajo del de la especie). Una planta de la presente invención no es preferentemente una planta *Cucumis melo* variedad *agrestis*.

El término "una planta de melón de número de acceso PI313970" se utiliza para indicar el origen del QTL con resistencia a closterovirus identificado en la presente invención, e incluye el número de acceso disponible de cualquiera de las colecciones públicas o institutos de depósitos conocidos por un experto en la materia, así como derivados del mismo resistentes a closterovirus.

El término "closterovirus", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un virus de la familia de *Closteriviridae*, que incluye, pero sin limitarse a éstos, virus a los que se hace referencia habitualmente como virus del trastorno del amarilleo y enanismo de las curcubitáceas (CYSDV), virus del amarillamiento infeccioso de la lechuga (LIB) y virus del falso amarilleo de la remolacha (BPYV; también denominado por sus sinónimos virus de manchas cloróticas del melón (CCSV), virus de amarilleo del melón, virus de amarilleo de melón almizclero o virus de la palidosis de la fresa), preferentemente BPYV y CYSDV, lo más preferente CYSDV.

Un "locus" se define en la presente invención como la posición que ocupa un gen determinado en un cromosoma de una especie determinada.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "heterozigótico" significa una condición genética que existe cuando alelos diferentes residen en locus correspondientes en cromosomas homólogos.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "homozigótico" significa una condición genética que existe cuando alelos idénticos residen en locus correspondientes en cromosomas homólogos.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "híbrido" significa cualquier hijo de un cruzamiento entre dos individuos genéticamente diferentes, incluyendo, pero sin limitarse éstos, entre dos líneas cosanguíneas.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "cosanguínea" significa un individuo o línea sustancialmente homozigótica.

Tal como se utiliza en la presente invención, los términos "introgresión", "introgresado" e "introgresar" se refieren a un proceso tanto natural como artificial, mediante el cual, los genes de una especie, variedad o cultivo se desplazan al genoma de otra especie, variedad o cultivo, mediante el cruzamiento de esas especies. El proceso se puede completar de manera opcional mediante el retrocruzamiento con el parental recurrente.

5 "Ingeniería genética", "transformación" y "modificación genética" se utilizan todos en la presente invención como sinónimos para la transferencia de genes aislados y clonados en el ADN, normalmente el ADN o genoma cromosómico de otro organismo,

10 El términos "resistente" y "resistencia" comprenden resistencia tanto parcial como completa a la infección. Una planta de melón susceptible a CYSDV puede ser no resistente o presentar niveles bajos de resistencia a la infección por CYSDV.

15 Tal como se utiliza en la presente invención, el término "parte de planta" indica una parte de la planta de melón, incluyendo células individuales y tejidos celulares, tales como células vegetales que están intactas en plantas, grupos de células y cultivos tisulares a partir de los cuales se pueden regenerar las plantas del melón. Entre los ejemplos de partes de planta se incluyen, pero sin limitarse a éstas, células individuales y tejidos de polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíces, anteras, flores, frutos, tallos, brotes y semillas; así como polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, puntas de raíces, anteras, flores, frutos, tallos, brotes, hijas, rizomas, semillas, protoplastos, callos y similares.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "población" significa una colección de plantas genéticamente heterogéneas que comparten un origen genético común.

25 Tal como se utiliza en la presente invención, el término "variedad cultivada" o "cultivo" significa un grupo de plantas similares que por sus características estructurales o genéticas y/o su acción se pueden diferenciar de otras variedades cultivadas de la misma especie. El término "variedad" sin ninguna indicación específica se puede referir tanto a una variedad botánica como cultivada y a cualquier de ellas dependiendo del contexto.

30 El término "QTL" se utiliza en la presente invención en su significado conocido en la técnica. El término "QTL asociado con la resistencia a CYSDV en melón", así como el término más corto "QTL para resistencia a CYSDV" se refieren a una región localizada en un cromosoma particular de melón que está asociado con, como mínimo, un gen que codifica para la resistencia a CYSDV o, como mínimo, una región reguladora, es decir, una región de un cromosoma que controla la expresión de uno o más genes implicados en la resistencia a CYSDV. La expresión fenotípica de ese gen se puede observar, por ejemplo, como una velocidad reducida de la replicación viral y/o como una velocidad reducida del movimiento viral a través de la planta. Un QTL puede comprender, por ejemplo, uno o más genes cuyos productos confieren la resistencia genética. De manera alternativa, un QTL puede comprender, por ejemplo, genes o secuencias reguladoras cuyos productos influyen en la expresión de genes en los otros locus en el genoma de la planta, confiriendo de este modo la resistencia a CYSDV. El QTL, tal como se da a conocer en la presente invención (QTL-1), se puede definir indicando su localización genética en el genoma del número de acceso de *Cucumis* salvaje respectivo utilizando uno o más marcadores genómicos moleculares. A su vez, uno o más marcadores indican un locus específico. Las distancias entre los locus se miden normalmente por la frecuencia de cruzamiento entre los locus en el mismo cromosoma y se expresan como centimorgan. Cuanto más separados están dos locus, más probable es que tenga lugar un cruzamiento entre ellos. En cambio, si dos locus están próximos, es menos probable que tenga lugar un cruzamiento entre ellos. Como regla, un centimorgan (función de mapa de Kosambi (cM)) es aproximadamente igual a un 1% de recombinación entre los locus (marcadores) (Lui, 1997). Cuando un QTL se puede indicar mediante múltiples marcadores, la distancia genética entre los marcadores de punto final es indicativa del tamaño del QTL.

50 El término "planta de melón receptora susceptible de CYSDV" se utiliza en la presente invención para indicar una planta de melón que va a recibir ADN obtenido de una planta de melón donante que comprende un QTL para la resistencia a CYSDV. Dicha "planta de melón receptora susceptible de CYSDV" puede ya comprender o no uno o más QTL para la resistencia a CYSDV, en cuyo caso el término indica una planta que va a recibir un QTL adicional.

55 El término "base genética natural" se utiliza en la presente invención para indicar la base genética original de un QTL. Dicha base es el genoma del melón de número de acceso PI313970. De este modo, el número de acceso PI313970 del melón representa la base genética natural del QTL de la presente invención. En cambio, un método que implica la transferencia de ADN que comprende el QTL o una parte del mismo que confiere resistencia, del cromosoma LG6 del número de acceso PI313970 del melón a la misma posición en el correspondiente cromosoma de otra especie de melón, dará lugar a que ese QTL, o dicha parte del mismo que confiere resistencia, no estará en su base genética natural.

65 Tal como se utiliza en la presente invención, el término "grupo de unión" se refiere a todos los genes o características genéticas que se localizan en el mismo cromosoma. En el grupo de unión, los locus que están suficientemente cerca mostrarán una unión en cruzamientos genéticos. Dado que la probabilidad de cruzamientos se incrementa con la distancia física entre genes en un cromosoma, los genes cuyas localizaciones están bastante

lejos entre sí en un grupo de unión, puede que no muestren ninguna unión detectable en las pruebas genéticas directas. El término "grupo de unión" se utiliza mayoritariamente para referirse a locus genéticos que muestran un comportamiento unido en sistemas genéticos donde no se han realizado todavía las asignaciones cromosómicas. De este modo, en el presente contexto, el término "grupo de unión" es sinónimo de cromosoma (la entidad física del mismo).

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "marcador molecular" se refiere a un indicador que se utiliza en métodos para visualizar diferencias en las características de secuencias de ácidos nucleicos. Ejemplos de dichos indicadores son marcadores de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), marcadores de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), mutaciones por inserción, marcadores microsatélites, regiones amplificadas caracterizadas por la secuencia (SCAR), marcadores de secuencias polimórficas amplificadas y cortadas (CAPS) o marcadores de isozimas o combinaciones de los marcadores descritos en la presente invención que definen una localización genética y cromosómica específica. Un "marcador molecular unido a QTL", tal como se define en la presente invención, puede referirse por tanto a SNP, mutaciones por inserción, así como marcadores AFLP más habituales o cualquier otro tipo de marcador utilizados en el sector. En el contexto de marcadores AFLP nombrados en la presente invención, los marcadores indican una secuencia de ADN específica de melón flanqueada por dos cebadores de AFLP, cuyos cebadores consisten en "cebadores centrales" E y M, correspondientes con los sitios de restricción de las enzimas de restricción EcoRI y MseI, (Vos y otros, 1995; Bai y otros 2003), cada uno seguido de un código de dos dígitos que identifica los nucleótidos selectivos mediante los cuales se extiende el "cebador central" (11: AA; 14: AT; 48: CAC; 49: CAG; 50: CAT; 51: CCA; 54: CCT; 57: CGG; 60: CTC). E11/M49-239 representa un marcador obtenido mediante la utilización de los cebadores de amplificación EcoRI + AA y MseI + CAG para producir un fragmento que tiene una longitud total de 239 pb que es el tamaño aproximado del fragmento polimórfico resultante (tamaño determinado $\pm$ 1-2 pares de bases). El tamaño normalmente se redondea, pero también se puede indicar con cifras decimales. La longitud del fragmento puede depender del método utilizado para detectar el fragmento y es una aproximación de su verdadera longitud.

El término "secuencia de ADN específica de melón" indica una secuencia de polinucleótidos que tiene una homología de secuencia de nucleótidos de más de un 80%, preferiblemente más de un 85%, más preferiblemente más de un 90%, incluso más preferiblemente más de un 95%, aún más preferiblemente más de un 97%, lo más preferible más de un 99% con una secuencia del genoma de la especie *Cucumis melo* que muestra la mayor similitud con la misma, preferiblemente en el caso de marcadores para el QTL de la presente invención, la parte de la secuencia de ADN de melón de número de acceso PI313970 que flanquea los marcadores de QTL-1.

El término "homología de secuencia de nucleótidos", tal como se utiliza en la presente invención, indica la presencia de homología entre dos polinucleótidos. Los polinucleótidos presentan secuencias "homólogas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para la correspondencia máxima. La comparación de secuencias entre dos o más polinucleótidos se realiza en general comparando partes de las dos secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. La ventana de comparación es generalmente de aproximadamente 20 a 200 nucleótidos contiguos. El "porcentaje de la homología de secuencia" para polinucleótidos, tal como un porcentaje de homología de secuencia de 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 ó 100, se puede determinar mediante la comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima sobre una ventana de comparación, donde la parte de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede incluir adiciones o deleciones (es decir, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante: (a) la determinación el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica aparece en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas; (b) división del número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación; y (c) multiplicación del resultado por 100 para producir el porcentaje de homología de secuencias. La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede realizar mediante implementaciones informáticas de algoritmos conocidos o mediante inspección visual. Los algoritmos de comparación de secuencias y de alineación de secuencias múltiples fácilmente disponibles son, respectivamente, la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica ("Basic Local Alignment Search Tool") (BLAST) (Altschul y otros, 1990, Altschul y otros, 1997) y los programas ClustalW, ambos disponibles en Internet. Entre otros programas adecuados se incluyen, pero sin limitarse a éstos, GAP, BestFit, PlotSimilarity, y FASTA en el Paquete Informático Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, Estados Unidos) (Devereux y otros, 1984).

Un locus de un carácter cuantitativo (QTL) asociado con la resistencia a closterovirus, tal como se describe en la presente invención, se observó por primera vez en una planta de melón de número de acceso PI313970. Después del análisis de AFLP, y la localización de intervalos de un gran número de marcadores de AFLP en el genoma de los cruzamientos entre PI313970 y cultivos de melón comercial, se observó que el QTL que confería resistencia a closterovirus estaba asociado con los marcadores E11/M54-156, E14/M54-152, E14/M51-210, E14/M51-083, E11/M49-239, E11/M54-169, E14/M50-262, E11/M57-278, E11/M54-163 y/o E11/M49-072, y se observó que se localizaba en el cromosoma equivalente del grupo de unión (LG) 6 en una región que comprende aproximadamente de 1,9 a aproximadamente 17,2 cM.

Los marcadores identificados en la presente invención se pueden utilizar en varios aspectos tal como se mostrará a continuación. Los aspectos no se limitan a la utilización de los marcadores identificados en la presente invención. Cabe destacar que los aspectos también pueden utilizar marcadores no descritos explícitamente en la presente invención o que incluso están aún por identificar. Aparte de la unidad genética "gen", sobre la que depende la expresión genotípica de una gran número de factores que no se pueden predecir, la unidad genética "QTL" indica una región en el genoma que está directamente relacionada con una característica fenotípica cuantificable. De este modo, mientras que los genes *per se* se presentan poca o ninguna relación con el cultivo de plantas, un QTL es directamente aplicable al cultivo de plantas. Dado que no se conocían QTL para la resistencia a closterovirus en melón antes de la presentación de la presente solicitud, se deduce que no existía una aplicación industrial de los genes de resistencia a closterovirus en métodos para el cultivo de plantas. Los presentes inventores han descubierto ahora un QTL para resistencia a closterovirus en melón que se transmite a plantas hijas. Los presentes inventores hicieron este descubrimiento observando que la presencia de una serie de marcadores genómicos contiguos que pertenecen al grupo de unión 6, es decir, en un único cromosoma en el genoma de melón se correlacionaba con la presencia de una característica fenotípica particular que afectaba a la aparición de síntomas de la enfermedad después de la exposición a una cantidad infecciosa de partículas virales de closterovirus en estos melones y mostraron que esta región genómica se heredaba según las leyes mendelianas de la herencia normales.

EL QTL descrito por primera vez en la presente invención se localiza en el cromosoma identificado en la presente invención como grupo de unión 6 y su localización se caracteriza mejor mediante un conjunto de marcadores de otro modo arbitrarios. En las presentes investigaciones, se utilizaron marcadores de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), aunque también se podrían haber utilizado marcadores de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de un único nucleótido (SNP), marcadores de microsatélites (por ejemplo, SSR), marcadores de regiones amplificadas caracterizadas por la secuencia (SCAR), marcadores de secuencias polimórficas amplificadas y cortadas o marcadores de isozimas o combinaciones de estos marcadores. En general, un QTL puede comprender una región de varios millones de bases. Por lo tanto, siempre que la información de la secuencia completa para el QTL sea prácticamente inasequible, además de innecesaria, dado que la manera en la que el QTL se detecta por primera vez, a través de la correlación observada entre la presencia de una serie de marcadores genómicos contiguos y la presencia de una característica particular, permite rastrear entre las plantas hijas, aquéllas que presentan un potencial genético para mostrar una característica fenotípica particular. La lista no limitante de marcadores proporciona la utilidad efectiva del QTL en un programa de mejoramiento.

El QTL, tal como se describe en la presente invención, se halló mediante el cruzamiento de *C. melo* variedad *agrestis* (PI 319370) con *C. melo* variedad *reticulatis* (galia) y el cribado por la resistencia a CYSDV utilizando un bioensayo convencional (pruebas de campo bajo presión natural del CYSDV). Se consideró que las valoraciones LOD para los marcadores de AFLP significativamente superiores a 3 indicaban el QTL.

Un marcador es específico para una línea particular de cultivo. De este modo, se asocia una característica específica con un marcador particular. Los marcadores, tal como se indica en la presente solicitud, no sólo indican la localización del QTL, sino que también se correlacionan con la presencia de la característica fenotípica específica en una planta. Es importante indicar que los marcadores genómicos contiguos que indican la localización del QTL en el genoma son, en principio, arbitrarios o no limitantes. En general, la localización de un QTL se indica mediante una serie contigua de marcadores que muestran una correlación estadística con la característica fenotípica. Una vez un marcador se halla fuera de esa serie (es decir, un marcador que presenta un valor LOD por debajo de cierto valor umbral, indicando que el marcador es tan remoto que la recombinación en la región entre ese marcador y el QTL ocurre tan frecuentemente que la presencia del marcador no se correlaciona de una manera estadísticamente significativa con la presencia del fenotipo), se establecen los límites del QTL. De este modo, también es posible indicar la localización del QTL mediante otros marcadores localizados en esa región especificada.

También es importante indicar que los marcadores genómicos contiguos también se pueden utilizar para indicar la presencia del QTL (y, de este modo, del fenotipo) en una planta individual, es decir se pueden utilizar en procedimientos de selección asistida por marcadores (MAS). En principio, el número de marcadores potencialmente útiles está limitado, pero puede ser muy grande y el experto en la materia puede identificar fácilmente marcadores adicionales además de los mencionados en la presente solicitud. En procedimientos MAS se puede utilizar cualquier marcador que se una al QTL, por ejemplo que se encuentre en los límites físicos de la región genómica comprendida por los marcadores habiendo establecido valores de LOD por encima de un cierto valor umbral, indicando de este modo que no se produce recombinación, o una recombinación muy pequeña, entre el marcador y el QTL en los cruzamientos; así como cualquier marcador en desequilibrio de unión al QTL; así como marcadores que representan las mutaciones causales reales en el QTL. Esto significa que los marcadores identificados en la presente solicitud asociados con el QTL, tales como el marcador de AFLP E11/M49-239, son simplemente ejemplos de marcadores adecuados para utilizar en los procedimientos MAS. Además, cuando el QTL, o la parte del mismo que confiere la característica específica, se introgre en otra base genética (es decir, en el genoma de otra especie de planta), entonces algunos marcadores pueden que ya no se encuentren en la planta hija, aunque la característica esté presente en la misma, indicando que dichos marcadores están fuera de la región genómica que representa la parte del QTL que confiere la característica específica sólo en la línea parental original y que la nueva base genética presenta una organización genómica diferente.

De este modo, un método para producir una planta tal como se describe en la presente invención, que comprende introgresar en una planta de melón susceptible al closterovirus el QTL que confiere resistencia a closterovirus del melón de número de acceso PI313970, y que implica procedimientos MAS, no se limita a la utilización de marcadores que se proporcionan en la presente invención con el único objetivo de indicar (aproximadamente) la localización del QTL en el cromosoma. El experto en la materia sabe que otros marcadores pueden proporcionar una utilidad, como mínimo, igual en dichos procedimientos MAS.

La mutación causal del QTL, es decir, una mutación en el ADN comprendido en el QTL, que, por ejemplo, da lugar a un cambio en una secuencia que codifica la proteína o afecta en la expresión de un gen de manera que conduce al fenotipo observado, no siempre está definida. Sin embargo, ésta en sí no provoca ninguna consecuencia en la presente invención, ya que cualquiera de los marcadores asociados con el QTL y presentes en una planta seleccionada indica la presencia de la mutación causal en esa planta.

Debido a la necesidad de tiempo para pruebas fiables y reproducibles de la enfermedad que permitirían la identificación y localización de material genético responsable de conferir resistencia a closterovirus, la utilización de marcadores unidos al QTL identificado en la presente invención ayudará en la creación de resistencia a closterovirus en melón.

La secuencia de ácidos nucleicos de un QTL descrito en la presente invención se puede determinar mediante métodos conocidos para el experto en la materia. Por ejemplo, se puede aislar una secuencia de ácidos nucleicos que comprende dicho QTL o una parte del mismo que confiere resistencia, de una planta donante resistente a closterovirus mediante la fragmentación del genoma de dicha planta y la selección de aquellos fragmentos que albergan uno o más marcadores indicativos de dicho QTL. Posteriormente, o alternativamente, las secuencias de marcadores (o partes de las mismas) indicativas de dicho QTL se pueden utilizar como cebadores de amplificación (PCR) a efectos de amplificar una secuencia de ácido nucleico que comprende dicho QTL de una muestra de ácido nucleico genómico o un fragmento de genoma obtenido de dicha planta. A continuación, la secuencia amplificada se puede purificar a efectos de obtener el QTL aislado. A continuación, se puede obtener la secuencia de nucleótidos del QTL, y/o de cualquier marcador adicional comprendido en el mismo mediante métodos de secuenciación estándar.

También se describe en la presente invención una secuencia de ácidos nucleicos aislada (preferentemente ADN) que comprende un QTL descrito en la presente invención, o una parte del mismo que confiere resistencia a closterovirus. De este modo, se pueden utilizar los marcadores que ubican los diversos QTL descritos en la presente invención para la identificación, aislamiento y purificación de uno o más genes de melón que codifican para la resistencia a closterovirus.

La secuencia de nucleótidos de un QTL descrito en la presente invención se puede resolver, por ejemplo, mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores asociados con dicho QTL y el diseño de cebadores internos para dichas secuencias de marcadores que a continuación se pueden utilizar para determinar posteriormente la secuencia del QTL fuera de dichas secuencias de marcadores. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de los marcadores de AFLP identificados en la presente invención se puede obtener mediante el aislamiento de dichos marcadores del gel de electroforesis utilizado en la determinación de la presencia de dichos marcadores en el genoma de una planta objeto y la determinación de la secuencia de nucleótidos de dichos marcadores mediante, por ejemplo, métodos de terminación de cadena con dideoxi, conocidos en la técnica.

En dichos métodos para detectar la presencia de un QTL en una planta de melón resistente a closterovirus sospechosa, el método puede comprender también las etapas de disponer un oligonucleótido o polinucleótido capaz de hibridarse bajo condiciones de hibridación severas a una secuencia de ácidos nucleicos de un marcador unido a dicho QTL, preferentemente seleccionado entre los marcadores identificados en la presente invención por estar unidos a dicho QTL, poner en contacto dicho oligonucleótido o polinucleótido con un ácido nucleico genómico de una planta de melón resistente a closterovirus sospechosa, y determinar la presencia de hibridación específica de dicho oligonucleótido o polinucleótido a dicho ácido nucleico genómico. Preferentemente, dicho método se realiza sobre una muestra de ácido nucleico obtenida de dicha planta de melón resistente a closterovirus sospechosa, aunque también se pueden utilizar métodos de hibridación in situ. Alternativamente, y en una realización más preferente, el experto en la materia puede diseñar, una vez se ha determinado la secuencia de nucleótidos del QTL, sondas de hibridación específicas u oligonucleótidos capaces de hibridarse bajo condiciones de hibridación severas a la secuencia de ácido nucleico de dicho QTL y puede utilizar dichas sondas de hibridación en métodos para detectar la presencia de un QTL descrito en la presente invención en una planta de melón resistente a closterovirus sospechosa.

La frase "condiciones de hibridación severas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda o polinucleótido se hibridará a su subsecuencia diana, habitualmente una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero esencialmente no a otras secuencias. Las condiciones severas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Una guía extensa de la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (Tijssen, 1993). En general, las condiciones

severas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10°C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácidos nucleicos definidos) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan a la secuencia diana en equilibrio (dado que las secuencias diana se encuentran presentes en exceso, a T_m , el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones severas son aquellas en las que la concentración de sal es inferior a una concentración aproximadamente de 1,0 M de ión sodio, habitualmente aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de ión sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es, como mínimo, aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y, como mínimo, aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). Las condiciones severas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es, como mínimo, dos veces la línea base, preferentemente 10 veces la hibridación base. Ejemplos de condiciones de hibridación severas son a menudo: formamida al 50%, 5 x SSC, y SDS al 1%, incubación a 42°C, o, 5 x SSC, SDS al 1%, incubación a 65°C, con lavado en 0,2 x SSC, y SDS al 0,1% a 65°C. Para PCR, una temperatura de aproximadamente 36°C es habitual para amplificación de baja severidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 32°C y 48°C dependiendo de la longitud del cebador. Las directrices adicionales para determinar los parámetros de hibridación están disponibles en numerosas referencias, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel, y otros, 1995).

"Ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido" o equivalentes gramaticales utilizados en la presente invención significa, como mínimo, dos nucleótidos unidos covalentemente. Los oligonucleótidos tienen habitualmente aproximadamente 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 40, 50 ó hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos y polinucleótidos son polímeros de cualquier longitud, incluyendo longitudes más largas, por ejemplo, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10.000, etc. Un ácido nucleico tal como se da a conocer en la presente invención comprenderá en general enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden presentar esqueletos alternados, que comprenden, por ejemplo, uniones fosforamido, fosforotioato, fosforoditioato, u O-metilfosforoamidito (véase Eckstein, 1991), y esqueletos de ácidos nucleicos peptídicos y uniones. Se pueden utilizar mezclas de ácidos nucleicos naturales y análogos. Los análogos particularmente preferentes para oligonucleótidos son ácidos nucleicos peptídicos (PNA).

Producción de plantas de melón resistentes a closterovirus mediante métodos transgénicos

Una planta de melón resistente a closterovirus, o parte de la misma, según la presente invención, comprende en su genoma un QTL asociado con la resistencia a closterovirus, o una parte del mismo que confiere resistencia a closterovirus, tal como se definió anteriormente en la presente invención y derivado del número de acceso PI313970 de melón, en la que dicho QTL o dicha parte del mismo que confiere resistencia a closterovirus no está en su base genética natural. Dicha planta se puede obtener mediante varios métodos conocidos en la técnica, ya sea transgénico o no transgénico.

Se puede utilizar una secuencia de ácido nucleico (preferentemente ADN) que comprende el QTL, tal como se describe en la presente invención, o una parte del mismo que confiere resistencia a closterovirus para la producción de una planta de melón resistente a closterovirus. En la presente invención se describe la utilización de un QTL, tal como se describe en la presente invención, o partes del mismo que confieren resistencia a closterovirus, para producir una planta de melón resistente a closterovirus, cuya utilización implica la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos que comprende dicho QTL en una planta de melón receptora susceptible de closterovirus. Tal como se afirma, dichas secuencias de ácidos nucleicos puede derivar de una planta de melón donante resistente a closterovirus adecuada. Una planta de melón donante resistente a closterovirus adecuada capaz de proporcionar una secuencia de ácidos nucleicos que comprende el QTL descrito más arriba en la presente invención, o una parte del mismo que confiere resistencia a closterovirus, es *Cucumis melo* de número de acceso PI313970. Otras plantas de melón relacionadas que muestran resistencia a closterovirus y comprenden uno o más genes que codifican para la resistencia a closterovirus también se pueden utilizar como plantas donantes con resistencia a closterovirus, ya que la presente invención describe cómo se puede identificar este material. Se pueden examinar otros números de acceso de *Cucumis melo* para la resistencia a closterovirus, ya sea mediante la utilización de cribados en bioensayos o mediante la utilización de procedimientos MAS con un marcador específico para el QTL descrito en la presente invención.

Un QTL, tal como se describe en la presente invención, se descubrió por primera vez en *Cucumis melo* de número de acceso PI313970, aunque también se pueden cribar otros números de acceso de melón para la presencia de este QTL. Una vez identificada en una planta de melón donante adecuada, la secuencia de ácido nucleico que comprende un QTL para resistencia a closterovirus, tal como se describe en la presente invención, o una parte del mismo que confiere resistencia a closterovirus, se puede transferir a una planta receptora adecuada mediante cualquier método disponible. Por ejemplo, dicha secuencia de ácidos nucleicos se puede transferir mediante cruzamiento de una planta de melón donante con resistencia a closterovirus con una planta de melón receptora susceptible, o incluso una planta de otro género, (es decir, mediante introgresión), mediante transformación, mediante fusión de protoplastos, mediante la técnica de haploide duplicado o mediante el rescate embrionario o mediante cualquier otro sistema de transferencia de ácidos nucleicos, opcionalmente seguido por la selección de plantas hijas que comprenden el QTL y muestran resistencia a closterovirus. Para los métodos transgénicos de

transferencias, se pueden aislar de dichas plantas donantes secuencias de ácidos nucleicos que comprenden un QTL para resistencia a closterovirus, tal como se describe en la presente invención, o una parte del mismo que confiere resistencia a closterovirus, mediante la utilización de métodos conocidos en la técnica y la secuencia de ácidos nucleicos aislada de este modo se puede transferir a la planta receptora mediante métodos transgénicos, por ejemplo, mediante un vector, en un gameto, o mediante cualquier otro elemento de transferencia adecuado, tal como una partícula balística recubierta con dicha secuencia de ácidos nucleicos.

La transformación de las plantas implica en general la construcción de un vector de expresión que actuará en las células de las plantas. Tal como se prevé en la presente invención, dicho vector comprende una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un QTL para resistencia a closterovirus tal como se describe en la presente invención, o una parte del mismo que confiere resistencia a closterovirus, cuyo vector puede comprender un gen que confiere resistencia a closterovirus que está bajo control de un elemento regulador, o unido de manera funcional al mismo, tal como un promotor. El vector de expresión puede contener uno o más de dichas combinaciones de elementos reguladores/genes unidos de manera funcional, siempre que, como mínimo, uno de los genes contenidos en las combinaciones codifique para la resistencia a closterovirus. El vector o vectores pueden estar en forma de plásmido, y se pueden utilizar solos o combinados con otros plásmidos en un método para producir plantas transgénicas que son resistentes a closterovirus utilizando métodos de transformación conocidos en la técnica, tales como el sistema de transformación de *Agrobacterium*.

Entre los vectores de expresión se pueden incluir, como mínimo, un gen marcador (informador), unido de manera funcional a un elemento regulador (tal como un promotor) que permite que las células transformadas que contienen el marcador se recuperen mediante selección negativa (mediante inhibición del crecimiento de las células que no contienen el gen marcador seleccionable), o mediante selección positiva (mediante cribado del producto codificado por el gen marcador). Muchos genes marcadores seleccionables utilizados habitualmente para la transformación de plantas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, genes que codifican enzimas que detoxifican metabólicamente un agente químico selectivo que puede ser un antibiótico o un herbicida, o genes que codifican una diana alterada que es insensible al inhibidor. En la técnica se conocen varios métodos de selección positiva, tales como la selección con manosa. De forma alternativa, se puede utilizar una transformación con menos marcadores para obtener plantas sin los genes marcadores mencionados, las técnicas de la cual son conocidas en la técnica.

Un método para introducir un vector de expresión en una planta se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium* (véase, por ejemplo, Horsch y otros, 1985). *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias de la tierra patógenas para las plantas que transforman genéticamente células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta (véase, por ejemplo, Kado, 1991). Entre los métodos de introducción de vectores de expresión en tejido de planta se incluyen la infección directa o el cocultivo de células vegetales con *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch y otros, 1985). Las descripciones de sistemas de vectores de *Agrobacterium* y métodos para la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* está disponible en Gruber y Crosby, 1993 y Moloney y otros, 1989. Véase también la Patente de Estados Unidos No. 5.591.616. En Gruber y Crosby, 1993, se pueden encontrar descripciones generales de vectores de expresión y genes informadores de plantas y protocolos de transformación y descripciones de los sistemas de vectores de *Agrobacterium* y métodos para la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*. Los métodos generales de cultivo de tejidos de plantas están disponibles, por ejemplo, en Miki y otros, 1993 y en Phillips, y otros, 1988. Un manual de referencia adecuado para técnicas de clonación molecular y vectores de expresión adecuados es Sambrook y Russell (2001).

Otro método para introducir un vector de expresión en una planta se basa en la transformación mediada por microproyectiles, en el que el ADN es transportado en la superficie de microproyectiles. El vector de expresión se introduce en los tejidos de la planta con un dispositivo biolístico que acelera los microproyectiles a velocidades de 300 a 600 m/s que es suficiente para penetrar las paredes y membranas celulares de la planta (Véase, Sanford y otros, 1987, 1993; Sanford, 1988, 1990; Klein y otros, 1988, 1992). Otro método para introducir ADN en plantas es a través de la sonicación de las células diana (véase, Zhang y otros, 1991). De forma alternativa, se ha utilizado la fusión a liposomas o esferoplastos para introducir vectores de expresión en plantas (véase, por ejemplo Deshayes y otros, 1985 y Christou y otros, 1987). También se ha descrito la captación directa de ADN en protoplastos utilizando precipitación con CaCl_2 , polivinil alcohol o poli-L-ornitina (véase, por ejemplo, Hain y otros 1985 y Draper y otros, 1982). También se ha descrito a electroporación de protoplastos y las células y tejidos completos (D'Halluin y otros, 1992 y Laursen y otros, 1994).

Después de la transformación de tejidos diana de melón, la expresión de los genes marcadores seleccionables descritos más arriba permite la selección preferencial de células, tejidos y/o plantas transformadas, utilizando métodos de regeneración y selección conocidos actualmente en la técnica. Los marcadores de AFLP, tal como se identifican en la presente invención, también se pueden utilizar para ese objetivo.

Producción de plantas de melón resistentes a closterovirus mediante métodos no transgénicos

En una realización alternativa para producir una planta de melón resistente a closterovirus, se puede utilizar la fusión a protoplastos para la transferencia de ácidos nucleicos desde una planta donante a una planta receptora. La fusión

a protoplastos es una unión inducida o espontánea, tal como una hibridación somática, ente dos o más protoplastos (células donde se extraen las paredes celulares mediante tratamiento enzimático) para producir una célula individual binuclear o multinuclear. La célula fusionada, que se puede obtener incluso con especies de plantas que no se pueden cruzar en la naturaleza, se cultiva en tejidos en una planta híbrida que muestra la combinación de características deseadas. Más específicamente, se puede obtener un primer protoplasto a partir de una planta de melón u otra línea de plantas que muestra resistencia a la infección por closterovirus. Se puede obtener un segundo protoplasto a partir de un segundo melón u otra línea de plantas, preferentemente una línea de melones que comprende características comercialmente valiosas, tales como, pero sin limitarse a la resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas de los frutos, etc. A continuación, los protoplastos se fusionan utilizando procedimientos tradicionales de fusión de protoplastos que son conocidos en la técnica.

Alternativamente, se puede utilizar el rescate de embriones en la transferencia de un ácido nucleico que comprende uno o más QTL, tal como se describe en la presente invención, de una planta donante a una planta receptora. El rescate de embriones se puede utilizar como procedimiento para aislar embriones de los cruzamientos, en los que las plantas no consiguen producir semillas viables. En este proceso, el ovario fertilizado o la semilla inmadura de una planta se cultiva en tejido para crear nuevas plantas (Pierik, 1999).

En la presente invención también se describe un método de producción de una planta de melón resistente a closterovirus que comprende las etapas de realizar un método para detectar la presencia de un locus de resistencia cuantitativa (QTL) asociado con la resistencia a closterovirus en una planta de melón donante tal como se ha descrito anteriormente, y transferir una secuencia de ácidos nucleicos que comprende, como mínimo, un QTL detectado de esta manera, o una parte del mismo que confiere resistencia a closterovirus, de dicha planta donante a una planta de melón receptora susceptible de closterovirus. La transferencia de dicha secuencia de ácidos nucleicos se puede realizar mediante cualquier de los métodos descritos previamente en la presente invención.

Una realización preferente de dicho método comprende la transferencia mediante introgresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos de una planta de melón donante resistente a closterovirus en una planta de melón receptora susceptible de closterovirus mediante el cruzamiento de dichas plantas. De este modo, esta transferencia se puede realizar de manera adecuada utilizando técnicas de cultivo tradicionales. Los QTL se integran preferentemente en líneas de melones comerciales utilizando el cultivo asistido por marcadores (MAS). El cultivo asistido por marcadores o la selección asistida por marcadores implican la utilización de uno o más de los marcadores moleculares para la identificación y selección de las plantas hijas que contienen uno o más de los genes que codifican para la característica deseada. En el presente caso, dicha identificación y selección se basan en la selección de QTL descritos en la presente invención o marcadores asociados con los mismos. También se pueden utilizar MAS para desarrollar líneas casi isogénicas (NIL) que comprenden el QTL de interés, permitiendo un estudio más detallado del efecto de cada QTL y también es un método eficaz para el desarrollo de poblaciones de línea cosanguínea por retrocruzamiento (BIL) (véase, por ejemplo, Nesbitt y otros, 2001; van Berloo y otros, 2001). Las plantas de melón desarrolladas según esta realización pueden derivar de manera ventajosa una mayoría de sus características de la planta receptora y derivar la resistencia a closterovirus de la planta donante.

Tal como se ha descrito brevemente más arriba, se pueden utilizar técnicas tradicionales de cultivo para introgresar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la resistencia a closterovirus en una planta de melón receptora susceptible de closterovirus. En un método, que se refiere como el cultivo del linaje, una planta de melón donante que muestra resistencia a closterovirus y que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para resistencia a closterovirus se cruza con una planta de melón receptora susceptible a closterovirus que muestra preferentemente características comercialmente deseables, tales como, pero sin limitarse a éstas, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características valiosas de los frutos, etc. A continuación, la población de plantas resultante (que representan los híbridos F_1) se autopoliniza y fija las semillas (semillas F_2). Las plantas F_2 desarrolladas a partir de las semillas F_2 se criban a continuación para la resistencia a closterovirus. La población se puede cribar de diferentes maneras.

En primer lugar, la población se puede cribar utilizando un cribado tradicional de enfermedades. Dichos cribados de enfermedades son conocidos en la técnica. Preferentemente, se utiliza un bioensayo cuantitativo. En segundo lugar, se puede realizar una selección asistida por marcadores utilizando uno o más de los marcadores moleculares descritos más arriba en la presente invención para identificar aquellas progenies que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la resistencia a closterovirus. También se pueden utilizar otros métodos referidos más arriba en la presente invención por métodos para detectar la presencia de un QTL. Además, también se puede utilizar la selección asistida por marcadores para confirmar los resultados obtenidos de los bioensayos cuantitativos y, por tanto, también se pueden utilizar varios métodos combinados.

Las líneas de plantas de melón cosanguíneas resistentes a closterovirus se pueden desarrollar utilizando las técnicas de selección recurrente y retrocruzamiento, autocruzamiento y/o dihaploides o cualquier otra técnica utilizada para producir líneas parentales. En un método de selección recurrente y el retrocruzamiento, se puede introgresar la resistencia a closterovirus en una planta receptora diana (la planta parental recurrente) mediante el cruzamiento de la planta parental recurrente con una primera planta donante, la cual difiere de la planta parental recurrente y se refiere en la presente invención como "planta parental no recurrente". La planta parental recurrente

es una planta que no es resistente o presenta un nivel bajo de resistencia a closterovirus y posee características comercialmente deseables, tales como, pero sin limitarse a resistencia a enfermedades (adicionales), resistencia a insectos, características valiosas de los frutos, etc. La planta parental no recurrente muestra resistencia a closterovirus y comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la resistencia a closterovirus. La planta parental no recurrente puede ser cualquier variedad planta o línea cosanguínea que es fértil por cruzamiento con la planta parental recurrente. La progenie resultante de un cruzamiento entre la planta parental recurrente y la planta parental no recurrente se retrocruza con la planta parental recurrente. A continuación, se criba la población de plantas resultantes por las características deseadas, cuyo cribado puede tener lugar de diferentes maneras. Por ejemplo, la población se puede cribar utilizando cribados de patologías fenotípicas o bioensayos cuantitativos conocidos en la técnica. Alternativamente, en lugar de utilizar bioensayos, se puede realizar una selección asistida por marcadores (MAS) utilizando uno o más de los marcadores moleculares descritos más arriba en la presente invención, sondas o polinucleótidos de hibridación para identificar aquella progenie que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la resistencia a closterovirus. Además, se puede utilizar MAS para confirmar los resultados obtenidos de los bioensayos cuantitativos. En el caso en que el QTL se localiza en un locus recesivo, esto significa que el gen de resistencia no se puede cribar en una población F_1 o BC_1 utilizando cribados fenotípicos, tales como bioensayos de resistencia. Los marcadores definidos en la presente invención son por tanto en última instancia adecuados para seleccionar plantas hijas adecuadas mediante cribado genotípico.

Después del cribado, las plantas híbridas F_1 que muestran un fenotipo resistente a closterovirus o, más preferentemente, un genotipo, y de este modo comprenden el requisito de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la resistencia a closterovirus, se seleccionan a continuación y se retrocruzan con la planta parental recurrente durante una serie de generaciones a efectos de permitir que la planta del melón sea cada vez más cosanguínea. Este proceso se puede realizar durante dos a cinco o más generaciones. En principio, la progenie resultante del proceso de cruzamiento de la planta parental recurrente con la planta parental no recurrente con resistencia a closterovirus es heterocigótica para uno o más genes que codifican para la resistencia a closterovirus.

Debe tenerse en cuenta que, por ejemplo, cuando se introduce un locus recesivo, el fenotipo resistente sólo aparecerá en plantas hijas bajo condiciones en las que se pueden formar plantas homocigóticas.

En general, un método de introducción de una característica deseada en una variedad híbrida de melón comprende las etapas de:

- (a) cruzar una planta de melón parental cosanguínea con otra planta de melón que comprende una o más características deseadas, para producir plantas de progenie F_1 , en la que la característica deseada se selecciona del grupo que consiste en resistencia a closterovirus-resistencia;
- (b) seleccionar dichas plantas de progenie F_1 que presentan la característica deseada para producir las plantas de progenie F_1 seleccionadas, preferentemente utilizando marcadores moleculares definidos en la presente invención;
- (c) retrocruzar las plantas de progenie seleccionadas con dicha planta de melón parental cosanguínea para producir plantas de progenie por retrocruzamiento;
- (d) seleccionar las plantas de progenie por retrocruzamiento que presentan la característica deseada y características morfológicas y fisiológicas de dicha planta de melón parental cosanguínea, en la que dicha selección comprende el aislamiento del ADN genómico y el análisis de dicho ADN por la presencia, como mínimo, de un marcador molecular para QTL-1, preferentemente tal como se describe en la presente invención;
- (e) repetir las etapas (c) y (d) dos o más veces sucesivamente para producir plantas de la tercera progenie o superior por retrocruzamiento;
- (f) de manera opcional autocruzar progenies por retrocruzamiento seleccionadas a efectos de identificar plantas homocigóticas;
- (g) cruzar, como mínimo, una de dichas plantas de progenie por retrocruzamiento o autocruzadas con otra planta de melón parental cosanguínea para generar una variedad híbrida de melón con la característica deseada y todas las características morfológicas y fisiológicas de la variedad híbrida del melón cuando crece en las mismas condiciones ambientales.

Tal como se indica, la última generación de retrocruzamiento se puede autocruzar a efectos de proporcionar una progenie de cultivo puro (cosanguínea) homocigótica para la resistencia a closterovirus. De este modo, el resultado, de la selección recurrente, el retrocruzamiento y el autocruzamiento es la producción de líneas que son genéticamente homogéneas para los genes asociados con resistencia a closterovirus, así como otros genes asociados con características de interés comercial.

Plantas y semillas de melón resistentes a Closterovirus

El objetivo de la mejora de plantas es combinar en una variedad única o híbrida diversas características deseables. Para los cultivos comerciales, estas características pueden incluir resistencia a enfermedades e insectos, tolerancia al calor y las sequías, reducir el tiempo de maduración del cultivo, mayor rendimiento y mejor calidad agronómica. La uniformidad de las características de la planta, tales como la germinación y el establecimiento de plantaciones, la velocidad de crecimiento, la madurez, y la altura de la planta, también pueden ser importantes.

Los cultivos comerciales se cultivan mediante técnicas que aprovechan el método de polinización de las plantas. Una planta se autopoliniza si el polen de una flor se transfiere a la misma flor u otra flor de la misma planta. Una planta se poliniza de forma sib cuando los individuos de la misma familia o línea se utilizan para la polinización. Una planta se poliniza por cruzamiento si el polen proviene de una flor en una planta diferente de una familia o línea diferente.

Las plantas que se han autopolinizado y seleccionado por el tipo durante muchas generaciones se vuelven homocigóticas en casi todos los locus del gen y producen una población uniforme de una verdadera progenie de cultivo. Un cruzamiento entre dos líneas homocigóticas diferentes produce una población uniforme de plantas híbridas que pueden ser heterocigóticas para muchos locus del gen. Un cruzamiento de dos plantas, cada una heterocigótica, en un conjunto de locus del gen producirá una población de plantas heterocigóticas que difieren genéticamente y no serán uniformes.

El desarrollo de una variedad híbrida de melón en un programa de mejora de plantas de melones implica tres etapas: (1) la selección de plantas de varios grupos de germoplasmas para cruzamientos de cultivo iniciales; (2) el autocruzamiento de las plantas seleccionadas de los cruzamientos de cultivo durante varias generaciones para producir una serie de líneas cosanguíneas, que, individualmente son variedades verdaderas y altamente uniformes; y (3) el cruzamiento de una línea cosanguínea seleccionada con una línea cosanguínea no relacionada para producir la progenie híbrida (F1). Después de una cantidad suficiente de cosanguinidad, las generaciones filiales sucesivas simplemente servirán para incrementar la siembra de las plantas cosanguíneas desarrolladas. Preferentemente, una línea cosanguínea debe comprender alelos homocigóticos en aproximadamente el 95% o más de sus locus.

Una consecuencia importante de la capacidad homocigótica y homogénea de las líneas cosanguíneas es que el híbrido creado por cruzamiento de una pareja definida de plantas cosanguíneas siempre será el mismo. Una vez se han identificado las plantas consanguíneas que crean un híbrido superior, se puede producir un suministro continuo de semillas híbridas utilizando estas plantas parentales cosanguíneas y, a continuación, las plantas de melón híbridas se pueden generar a partir de este suministro de semillas híbridas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una planta de melón resistente a closterovirus, o parte de la misma, que comprende los QTL en cualquier configuración descrita en detalle anteriormente, en la que, como mínimo, uno de dichos QTL no está en su base genética natural. Las plantas de melones resistentes a closterovirus de la presente invención pueden ser de cualquier tipo genético, tales como cosanguíneas, híbridas, haploides, dihaploides o transgénicas. Además, las plantas de la presente invención son homocigóticas para la característica de resistencia. Aunque los QTL, tal como se describen en la presente invención, así como las partes de los mismos que confieren resistencia, se pueden transferir a cualquier planta a efectos de proporcionar una planta resistente a closterovirus, los métodos y plantas de la presente invención están relacionados con plantas de la especie *Cucumis melo*.

Las líneas de melones cosanguíneos resistentes a closterovirus descritas en la presente invención se pueden utilizar en cruzamientos adicionales para crear plantas híbridas resistentes a closterovirus. Por ejemplo, una primera planta de melón cosanguínea resistente a closterovirus de la presente invención se puede cruzar con una segunda planta de melón cosanguínea que posee características deseables comercialmente, tales como, pero sin limitarse a éstas, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, características deseables de los frutos, etc. Esta segunda línea de melón cosanguínea puede ser o no resistente a closterovirus.

Otro aspecto se refiere a un método de producción de semillas que se pueden desarrollar en plantas de melones resistentes a closterovirus. En una realización, el método comprende las etapas de proporcionar una planta de melón resistente a closterovirus de la presente invención, cruzar dicha planta resistente a closterovirus con otra planta de melón, y recoger las semillas resultantes de dicho cruzamiento, que cuando se plantan, producen plantas de melón resistentes a closterovirus.

En otra realización, el método comprende las etapas de proporcionar una planta de melón resistente a closterovirus de la presente invención, cruzar dicha planta resistente a closterovirus con una planta de melón, cruzar dicha planta resistente a closterovirus con una planta de melón, recoger las semillas resultantes de dicho cruzamiento, regenerar dichas semillas en plantas, seleccionar las plantas resistentes a closterovirus mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente invención, autopolinizar las plantas seleccionadas durante un número suficiente de

generaciones para obtener plantas que están fijadas para un alelo que confiere resistencia a closterovirus en las plantas, retrocruzar las plantas producidas de este modo con plantas de melones que presentan características fenotípicas deseables durante un número suficiente de generaciones para obtener plantas de melones que son resistentes a closterovirus y presentan características fenotípicas deseables y recoger las semillas producidas de las plantas resultantes del último retrocruzamiento, que, cuando se plantan, producen plantas de melones que son resistentes a closterovirus.

REFERENCIAS

- 10 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool (Herramienta de búsqueda de alineación local básica). *J. Molec. Biol.* 215:403-410.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs (BLAST y PSI-BLAST gapped: Una nueva
15 generación de programas de búsqueda de bases de datos de proteínas). *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Bai YL, Huang CC, van der Hulst R, Meijer Dekens F, Bonnema G, Lindhout P (2003) QTLs for melon powdery mildew resistance (*Oidium lycopersici*) in *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 co-localize with two qualitative powdery
20 mildew resistance genes (Los QTL para resistencia a oidio de melon (*Oidium lycopersici*) en *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 se colocan con dos genes cualitativos para resistencia a oidio). *Mol. plant microbe interactions* 16: 169-176.
- Christou P, Murphy JE, y Swain WF (1987) Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus (Trasformación estable de soja mediante electroporación y formación de raíces a partir de
25 callo transformado). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3962-3966.
- Deshayes A, Herrera-Estrella L, Caboche M (1985) Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an plasmid (Transformación mediada por liposomas de los protoplastos mesofílicos de tabaco mediante un plásmido de *Escherichia coli*). *EMBO J.* 4:2731-2737.
30
- D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J (1992) *Plant. Cell* 4: 1495-1505.
- Draper J, Davey MR, Freeman JP, Cocking EC y Cox BJ (1982) Ti plasmid homologous sequences present in tissues from *Agrobacterium* plasmid transformed *Petunia* protoplasts (Secuencias homólogas del plásmido Ti presentes en tejidos de protoplastos de *Petunia* transformados con plásmido de *Agrobacterium*). *Plant and Cell
35 Physiol.* 23, 451-458.
- Eckstein F (ed) (1991) *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach* (Oligonucleótidos y Análogos, una Aproximación Práctica). Oxford Univ. Press, NY 1991.
40
- Gruber MY, Crosby WL (1993) Vectors for plant transformation (Vectores para la transformación de plantas). En BR Glick, JE Thompson, eds, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Baton Rouge, LA, pp 89-119.
- Hain R, Stabel P, Czernilofsky AP, Steinbliss HH, Herrera-Estrella L, Schell J (1985) Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene to plant protoplasts (Captación, integración, expresión y transmisión genética de un gen quimérico seleccionable para protoplastos de plantas). *Mol. Gen. Genet.* 199:161-168.
45
- Horsch RB, Fraley RT, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A (1985) A simple and general method for transferring genes into plants (Un método simple y general para transferir genes en plantas). *Science* 227: 1229-1231.
50
- Kado CI (1991): Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis (Mecanismos moleculares de tumorigénesis en el cuello). *Crit. Rev. Plant Sci.* 10, 1-32.
55
- Klein TM, Arentzen R, Lewis PA, y Fitzpatrick-McElligott S (1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment (Transformación de microbios, plantas y animales mediante bombardeo de partículas). *Bio/Technology* 10:286-291.
- Laursen CM, Krzyzek RA, Flick CE, Anderson PC, Spencer TM (1994) Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells (Producción de maíz transgénico fértil mediante electroporación de células de cultivo en suspensión). *Plant Mol Biol.* 24(1):51-61.
60
- López-Sesé AI, Gómez-Guillamón ML (2000) Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) in *Cucumis melo* L. (Virus del trastorno del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas (CYSDV) en *Cucumis melo* L). *Hortscience* 35:110-113.
65

- Lui B H (1997) Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis (Genómica Estadística: Unión, Localización y Análisis de QTL). CRC Press, Boca Raton, FL.
- 5 Miki BL, Fobert PF, Charest PJ, Iyer VN. 1993. Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants (Procedimientos para introducir ADN foráneo en plantas). En: Glick BR y Thompson JE (Eds.) Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology, CRC Press, pp. 67-88.
- 10 Moloney MM, Walker JM, Sharma KK (1989) High efficiency transformation of Brassica napus using Agrobacterium vectors (Transformación de eficacia elevada de Brassica napus utilizando vectores de Agrobacterium). Plant Cell Rep 8: 238-242.
- 15 Nesbitt TC, Tanksley SD (2001) fw2.2 directly affects the size of developing tomato fruit, with secondary effects on fruit number and photosynthate distribution (fw2.2 afecta directamente al tamaño de desarrollo del fruto del tomate con efectos secundarios en el número de frutos y la distribución de fotosintato). Plant Physiol. 127: 575-583.
- 20 Phillips RL, Somers DA, Hibberd KA. 1988. Cell/tissue culture and in vitro manipulation (Cultivo celular/tisular y manipulación in vitro). En: G.F. Sprague & J.W. Dudley, eds. Corn and corn improvement, 3rd ed., p. 345-387. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy.
- 25 Sambrook J, y Russell DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación molecular: Un Manual de Laboratorio). Nueva York, NY, USA., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process (Liberación de sustancias en células y tejidos utilizando un proceso de bombardeo de partículas). J. Particulate Sci. Technol. 5:27-37.
- Sanford JC (1988) The biolistic process (El proceso biolístico). Trends in Biotechnology 6:299-302.
- 30 Sanford JC (1990) Biolistic plant transformation (Transformación biolística de plantas). Physiologica Plantarum, 79, 206-209.
- 35 Sanford JC, Smith FD, y Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications (Optimización del proceso biolístico para diferentes aplicaciones biológicas). Methods in Enzymology 217:483-509.
- Tijssen P (1993) Hybridization With Nucleic Acid Probes. Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation (Hibridación con Sondas de Ácido Nucleico. Parte I. Teoría y Preparación de Ácidos Nucleicos). En: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier.
- 40 Van Berloo R, Aalbers H, Werkman A, Niks RE (2001) Resistance QTL confirmed through development of QTL-NILs for barley leaf rust resistance (Los QTL de resistencia se confirmaron a través del desarrollo de QTL-NIL para la resistencia a royas de la hoja de cebada). Mol. Breeding 8: 187-195.
- 45 Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting (AFLP: una nueva técnica para el "fingerprinting" de ADN). Nucl. Acids Res. 23: 4407-4414.
- 50 Zhang L, Cheng L, Xu N, Zhao M, Li C, Yuan J, y Jia S (1991) Efficient transformation of tobacco by ultrasonication (Transformación eficiente del tabaco mediante ultrasonidos). Biotechnology 9:996-997.

REIVINDICACIONES

1. Planta de la especie *Cucumis melo* resistente a CYSDV, comprendiendo dicha planta una introgresión de una planta de melón de número de acceso PI 313970, cuya introgresión comprende un QTL que confiere resistencia a CYSDV o una parte del mismo que confiere resistencia a CYSDV unidos a, como mínimo, un marcador localizado en el cromosoma equivalente al grupo de unión (LG) 6 del número de acceso de melón PI 313970, en la que dicho marcador es E11/M49-239 y en la que dicho QTL o dicha parte del mismo está presente en forma homocigótica.
2. Planta, según la reivindicación 1, en la que dicha planta de la especie *Cucumis melo* es un cultivo de melones y/o una planta del grupo que comprende las variedades botánicas *Cucumis melo* variedad *cantalupensis*, *Cucumis melo* variedad *reticulatis* o *Cucumis melo* variedad *inodorus*.
3. Planta, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha planta es una planta cosanguínea o una planta híbrida.
4. Parte de una planta, tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
5. Parte de una planta, según la reivindicación 4, en la que dicha planta es una planta cosanguínea o una planta híbrida y dicha parte de planta es una semilla o un fruto.

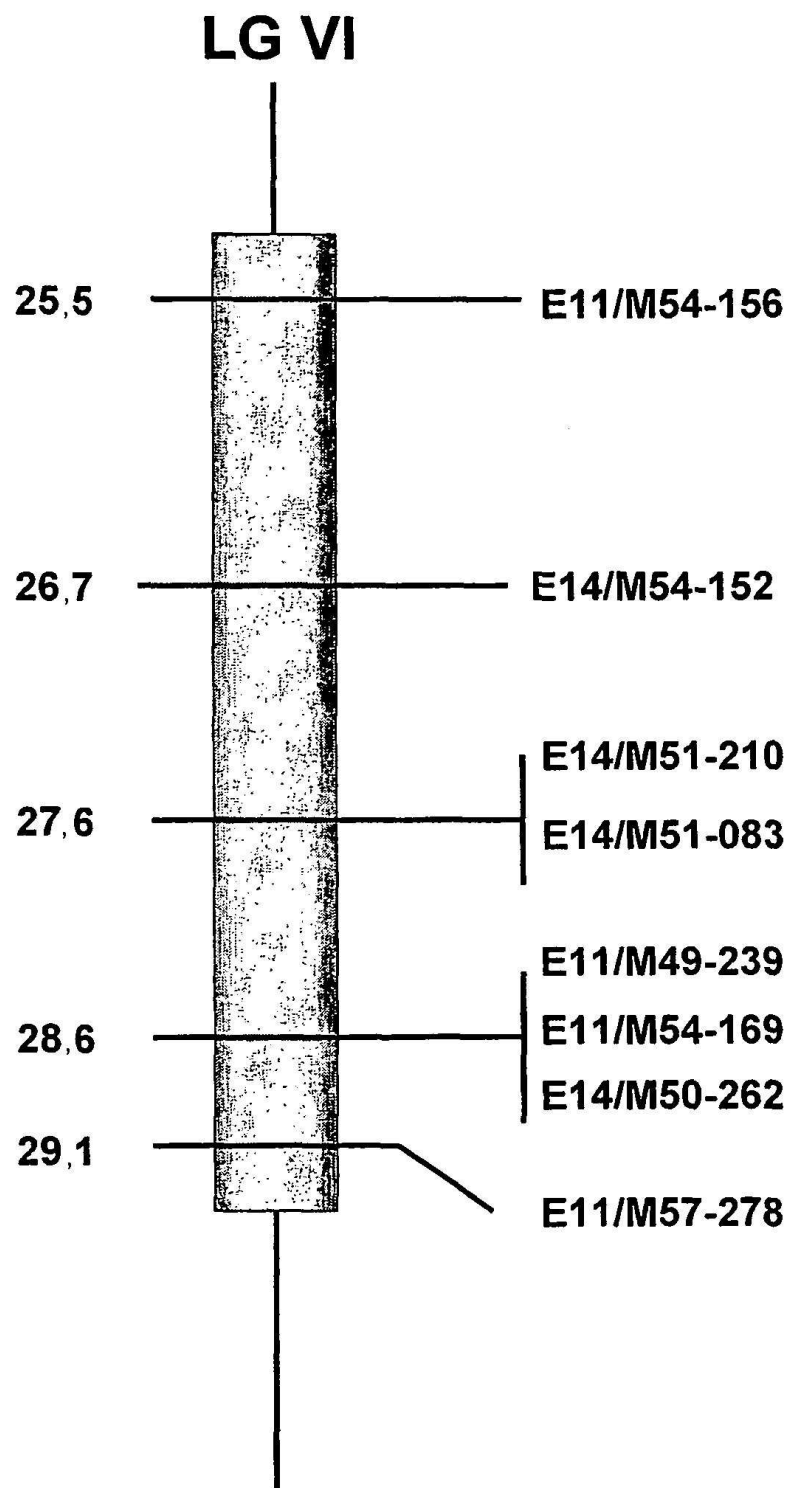


Figura 1