



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0620189-0 A2**

(22) Data de Depósito: 21/12/2006
(43) Data da Publicação: 15/01/2013
(RPI 2193)



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

(54) Título: PLANTA, PARTE DE UMA PLANTA, LOCAL DE TRAÇO QUANTITATIVO CONFERIDO RESISTÊNCIA A CLOSTEROVÍRUS, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, MÉTODO DE PRODUIR UMA PLANTA DE MELÃO RESISTENTE A CLOSTEROVÍRUS, SEMENTE DE MELÃO, E, USOS DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, E DE UM MARCADOR

(30) Prioridade Unionista: 21/12/2005 EP 05077953.7

(73) Titular(es): De Ruitter Seeds R&D B. V.

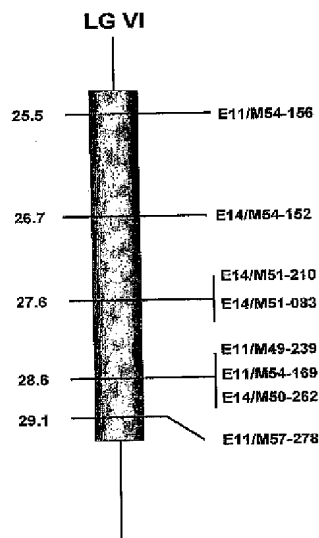
(72) Inventor(es): Jeroen Sebastiaan De Vries, Petrus Jacobus Kraakman, René Johannes Maria Hofstede

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT NL2006000650 de 21/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/073167de 28/06/2007

(57) Resumo: PLANTA, PARTE DE UMA PLANTA, LOCAL DE TRAÇO QUANTITATIVO CONFERINDO RESISTÊNCIA A CLOSTEROVÍRUS, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, MÉTODO DE PRODUIR UMA PLANTA DE MELÃO RESISTENTE A CLOSTEROVÍRUS, SEMENTE DE MELÃO, E, USOS DE UM ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, E DE UM MARCADOR. A presente invenção refere-se a planta de espécie Cucumis melo, referida planta compreendendo um elemento genético derivado de uma planta espécie Cucumis melo var, agrestis, cujo elemento genético compreende um QTL conferindo resistência a closterovírus ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo ligado a pelo menos um marcador localizado no cromossomo equivalente a um grupo de ligação (LG) 6 de melão acesso PI 313970, em que referida planta não é melão acesso PI313970.



“PLANTA, PARTE DE UMA PLANTA, LOCAL DE TRAÇO QUANTITATIVO CONFERINDO RESISTÊNCIA A CLOSTEROVÍRUS, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, MÉTODO DE PRODUZIR UMA PLANTA DE MELÃO RESISTENTE A CLOSTEROVÍRUS, SEMENTE DE MELÃO, E, USOS DE UM ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, E DE UM MARCADOR”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à reprodução e biologia molecular de plantas. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a um local de traço quantitativo (QTL) associado com resistência a closterovírus em melão, a uma planta de melão resistente a closterovírus compreendendo referido QTL e a um método de produzir uma planta de melão resistente a closterovírus.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O vírus do distúrbio do nanismo amarelo do melão (CYSDV) é um closterovírus transmitido na natureza pela mosca branca *Bemisia tabaci*, CYSDV foi primeiro detectado em 1982 nos Emirados Árabes, e desde então, foi encontrado na Espanha, Portugal, Marrocos, Líbano e América do Norte extensivamente afetando as culturas da cucurbitáceas. CYSDV induz manchas cloróticas interveias em folhas maduras que podem aumentar e eventualmente se fundir juntas produzindo amarelecimento da folha inteira exceto pelas veias que permanecem verdes. Os sintomas do amarelecimento são acompanhados por redução substancial em rendimento de frutas e qualidade e, assim, o vírus tem uma elevada importância econômica.

O controle de CYSDV é atualmente baseado em tratamentos químicos contra seu vetor e práticas culturais preventivas, ambos com sucesso limitado. O uso de cultivares geneticamente resistentes é uma boa opção para o controle de CYSDV.

Os acessos resistentes de melão (*Cucumis melo*), como acesso

C- 105 (TGR- 1551), foram recentemente encontrados (López-Sese et al., 2000). No principal, material genético destes acessos que compreende a informação genética responsável pela resistência a CYSDV pode ser introgridido em cultivares comerciais. No entanto, estas tentativas não obtiveram até agora sucesso por razões desconhecidas. Assim, nenhum cultivar de melão resistente é atualmente comercialmente disponível. Acredita-se que o problema prático de desenvolvimento de cultivares resistentes é impedido por dois fatores. Primeiro, não se sabe se este acesso específico como C-105 provê a melhor fonte de resistência. Se o resultado for um cultivar demonstrando resistência parcial, o resultado da introdução no mercado deste cultivar pode levar ao desenvolvimento de cepas virais rompendo a resistência. Além disso, a possibilidade de fixar estavelmente o traço de resistência no genoma da planta alvo permanece a ser determinado. Assim, escolher uma fonte particular de resistência não garante sucesso e pode mesmo acarretar vários riscos. Além disso, a própria introgressão envolve um esforço de reprodução substancial e inclui o desenvolvimento e desempenho de biotestes para seguir as plantas descendentes resistentes. Com efeito, o desenvolvimento de um cultivar resistente é um empreendimento comercial oneroso e qualquer programa pode ser logo abandonado quando os resultados deixam de aparecer.

A fim de reduzir a incerteza e trabalho envolvido no desenvolvimento de um cultivar resistente, seria benéfico ter um marcador genômico simples para o traço de resistência. Este marcador poderia então ser usado em procedimentos de seleção auxiliar por marcador (MAS) como parte de um programa de reprodução dedicado. Se este marcador pode ser encontrado é parcialmente determinado por estrutura genômica do traço de resistência. Se o traço for multi-gênico, não seria provável que um marcador único fosse encontrado que poderia ser usado de modo confiável nos procedimentos MAS. Além disso, o desenvolvimento do(s) próprio(s)

marcador(es) então chegaria a um empreendimento significativo, possivelmente ofuscando os custos e tempo envolvidos em um programa de reprodução direto.

No entanto, uma vez que uma fonte de resistência apropriada é identificado e um marcador é desenvolvido, as novas plantas resistentes podem ser facilmente traçadas, o que aumenta seu valor comercial.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção agora refere-se em um primeiro aspecto a uma planta da espécie *Cucumis melo*, referida planta compreendendo um elemento genético derivado de uma planta da espécie *Cucumis melo* var. *agrestis*, cujo elemento genético compreende um QTL conferindo resistência a closterovírus ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo ligado a pelo menos um marcador localizado no cromossomo equivalente a grupo de ligação (LG) 6 de melão acesso PI 313970, em que referida planta não é melão acesso PI 313970. Os acessos selvagens de plantas de *Cucumis melo* que são resistentes a closterovírus são conhecidos como ocorrendo na natureza (por exemplo melão acesso C-105, ver acima). As plantas de melão da espécie *Cucumis melo* var. *agrestis* como acesso PI323970), no entanto, não foram previamente associadas com resistência a closterovírus. Os presentes inventores verificaram agora que a resistência nesta variedade é ligada a uma região genética definida ou QTL (a seguir também indicado como QTL-1). Uma planta de melão da invenção compreende um elemento genético derivado da planta da espécie *Cucumis melo* var. *agrestis*, mais preferivelmente uma planta resistente a closterovírus da referida espécie, ainda mais preferivelmente de melão acesso PI313970, cujo elemento genético compreende o QTL conferindo resistência a closterovírus como identificado pelos presentes inventores.

Uma planta da presente invenção é preferivelmente um cultivar, mas não é necessariamente limitada a uma cepa específica. Uma

planta da presente invenção é preferivelmente uma planta tendo características comercialmente valiosas, incluindo, mas não limitado a plantas de melão tendo características de semente e fruta comercialmente valiosas.

A planta da invenção pode compreender o QTL referido, em uma forma em que os genes de resistência estão presentes em um alelo único, ou em uma forma em que os genes de resistência estão presentes em ambos os alelos. Assim, as plantas da presente invenção podem ser heterozigóticas ou homozigóticas para os traços de resistência, preferivelmente homozigóticas. Deve-se notar que neste aspecto apesar das plantas heterozigóticas não expressarem um traço recessivo, novas plantas que compreendem o QTL, ou genes conferindo resistência a closterovírus compreendidos aqui, em forma heterozigótica constituem um produto intermediário importante em um programa para desenvolver um cultivar resistente.

O QTL conferindo resistência a closterovírus da presente invenção (QTL-1) é preferivelmente associado com um marcador que está localizado no cromossomo equivalente de grupo de ligação (LG) 6 e se estende da posição 25,5 cM a 29,1 cM, preferivelmente em cerca da posição 28.6 cM no Mapa como apresentado na Fig. 1. A região onde o QTL está localizado é fortemente ligada aos 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 e/ou E11/M49-072, mais preferivelmente marcador E11/M49-239.

Uma planta resistente a closterovírus da espécie *Cucumis melo* pode ser qualquer espécie de *Cucumis melo*, com a condição que a planta não seja melão acesso PI313970. Assim, em uma planta da invenção, o QTL conferindo resistência a closterovírus como aqui definido não está em seu fundo genético natural de melão acesso PI313970. Uma outra forma de realização preferida, uma planta da presente invenção não é uma planta da espécie *Cucumis melo* var. *agrestis*. Uma outra forma de realização preferida,

uma planta da presente invenção é um cultivar de melão.

Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a uma parte de uma planta da invenção, como uma semente.

Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a um local de traço quantitativo (QTL) associado com resistência a closterovírus em uma planta de melão acesso PI313970. O QTL-1 conferindo resistência a closterovírus é associado com marcadores E11/M54-156 (cis), E14/M54-152 (cis), E14/M51-210 (cis), E14/M51-083 (trans), E11/M49-239 (cis), E11/M54-169 (cis), E14/M50-262 (trans), E11/M57-278 (cis), E11/M54-163 (cis) e/ou E11/M49-072 (trans), mais preferivelmente o marcador E11/M49-239, está localizado no cromossomo equivalente do grupo de ligação (LG) 6, e se estende da posição 25.5 cM a 29.1 cM. Como uma entidade física, QTL-1 é uma parte de um ácido nucleico, ou isolado ou em um fundo genômico, e é capaz de conferir resistência a closterovírus a uma planta no genoma da qual ele é introduzido, preferivelmente, em um local do genoma que é homólogo ao local no genoma de melão acesso PI313970, onde foi primeiro detectado e como especificado aqui.

Os próprios marcadores podem ser usados em aspectos da invenção com relação à seleção auxiliada por marcador e métodos em que as plantas tendo QTL são traçadas. Os marcadores usados em muitos aspectos podem ser ou marcadores trans, ou cis. Um marcador trans indica um polimorfismo resultando de introgressão de DNA exógeno (doador) no genoma da planta recipiente, cujo polimorfismo é ligado em cis com o genoma recipiente, isto é, ligado com o alelo oposto. Assim, marcadores cis são ligados com o alelo de interesse (isto é do doador), enquanto marcadores trans são ligados como o alelo oposto (isto é do recipiente). No entanto, ambos são previsores para o alelo resistente codificado pelo QTL de interesse.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um método para produzir uma planta da presente invenção compreendendo a introdução em

uma planta de melão suscetível a closterovírus de um elemento genético derivado da planta da espécie *Cucumis melo* var. *agrestis*, mais preferivelmente de melão acesso PI313970, cujo elemento genético compreende o QTL conferindo resistência a closterovírus, como descrito em maiores detalhes acima.

A introdução do QTL, ou um ácido nucleico isolado compreendendo o QTL da invenção, uma parte conferindo resistência do mesmo, em uma planta de melão pode ser realizada por qualquer método bem conhecido do versado. Preferivelmente, a introdução é realizada por introgressão (cruzamento). Em tal forma de realização, um método da presente invenção compreende a etapa de cruzar uma planta de melão acesso PI313970, ou um derivado resistente a closterovírus da mesma, com uma planta de melão suscetível a closterovírus; coletar a semente do cruzamento, cultivar referida semente para produzir plantas de progênie F1, realizar endogamia ou retrocruzamento das referidas plantas de progênie F1 com o doador ou parental recipiente para produzir sementes F2; cultivar as referidas sementes F2 para produzir plantas de progênie F2; determinar a presença no genoma de pelo menos uma das referidas plantas de progênie F2 de um QTL conferindo resistência a closterovírus, em que referido QTL é caracterizado como descrito em maiores detalhes acima, em que a presença do referido QTL é confirmada por detecção da presença no DNA de referido pelo menos uma das plantas de progênie F2 de um marcador ligado ao referido QTL.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 representa um mapa de ligação indicando a posição relativa dos vários marcadores como mencionado aqui. As posições relativas no grupo de ligação 6 (LG-VI) são providas em cM. Somente os marcadores com posições conhecidas são indicados.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O termo "melão" como usado aqui refere-se às espécies

Cucumis melo L. (sin. *Cucumis chito*; *Cucumis dudaim aegyptiacus*; *Cucumis flexuosus*; *Cucumis melo* var. *acidulus*; *Cucumis melo* var. *aegyptiacus*; *Cucumis melo* var. *ameri*; *Cucumis melo* var. *duripulposus*; *Cucumis melo* var. *hibernus*; *Cucumis melo* var. *makuwa*; *Cucumis melo* var. *microspermus*; *Cucumis microspermus*; *Cucumis momordica*) e inclui ambos os acessos selvagens como os cultivares. *Cucumis melo* é às vezes considerado como consistindo da sub-espécie *Cucumis melo* subsp. *agrestis* e *Cucumis melo* subsp. *melo*. O último é então ainda sub-dividido nas variedades botânicas var. *cantalupensis* (também conhecida como cantaloupe, melão almiscarado, melão de pepônio reticulado, melão persa, melão-de-casca-de-carvalho_ . var. *chito*, var. *flexuosus*, var. *inodorus*, var. *momordica* (melão momordica), var. *reticulatis* e var. *texanus*. Melão acesso PI313970 como referido aqui, corresponde a *Cucumis melo* var. *agrestis*. Esta variedade botânica está crescendo como erva daninha em vários países da África e da Ásia. Este acesso tem o status biológicos de "selvagem". Suas frutas não são comestíveis.

O termo "cultivar" é usado aqui para denotar uma planta tendo um status biológicos diferente de status "selvagem", cujo status "selvagem" indica o estado original não cultivado, ou natural, de uma planta ou acesso. O termo "cultivar" (para variedade cultivada" inclui, mas não é limitado, a semi-natural, semi-selvagem, daninho, cultivar tradicional, Landrace, material de cruzamento, material de pesquisa, linhagem do procriador, pop sintética, híbrido, estoque fundador/ população de base, linhagem endogâmica (parental de cultivar híbrido), população segregante, mutante/ carga genética, e cultivar avançado/ melhorado.

Os exemplos de cultivares incluem as variedades cultivadas que pertencem aos grupos botânicos *Cucumis melo* var. *cantalupensis* (o grupo cantaloupe Charantais e italiano), *Cucumis melo* var. *reticulatis* (o grupo Galia e Ananas), e *Cucumis melo* var. *inodorus* (incluindo os tipos Piel

de Sapo, Yellow Canary, Branco e Honeydew). Assim, uma planta da presente invenção é preferivelmente uma planta das variedades botânicas de melão *cantalupensis*, *reticulatis* ou *inodorus*. O termo "var." indica uma *varietas* (um nível taxonômico abaixo do da espécie). Uma planta da presente invenção não é preferivelmente uma planta *Cucumis melo* var. *agrestis*.

O termo "uma planta de melão acesso PI313970" é usada para indicar a fonte do QTL de resistência a closterovírus identificada acima, e inclui o acesso como disponível de qualquer uma das coleções públicas ou instituições depositárias bem conhecidas do versado, assim como os derivados resistentes a closterovírus das mesmas.

O termo "closterovírus" como usado aqui, refere-se a um vírus da família de *Closteriviridae* incluindo mas não limitado a vírus comumente referidos como *vírus do distúrbio do nanismo amarelo de cucurbitáceas* (CYSDV), *vírus do amarelo infeccioso da alface* (LIYV) e vírus pseudo-amarelo de beterraba (BPYV, também conhecido sob seu sinônimo *vírus de mancha clorótica de melão* (CCSV), *vírus do amarelo do melão*, *vírus do amarelo do melão almiscarado* ou *vírus da palidose do morango*), preferivelmente BPYV e CYSDV, mais preferivelmente CYSDV.

Um "Local" é definido aqui como a posição que um dado gene ocupa em um cromossomo de uma dada espécie.

Como usado aqui o termo "heterozigótico" significa uma condição genética existente quando diferentes alelos residem em correspondentes *loci* em cromossomos homólogos.

Como usado aqui o termo "homozigótico" significa uma condição genética existente quando alelos idênticos residem em correspondentes *loci* em cromossomos homólogos.

Como usado aqui o termo "híbrido" significa qualquer descendência de um cruzamento entre dois indivíduos geneticamente diferentes, incluindo mas não limitado a cruzamento entre duas linhagens

endogâmicas.

Como usado aqui o termo "endogâmico" significa um indivíduo ou linhagem homozigótica.

5 Como usado aqui o termo "introgressão" "introgredido" e "introgredindo" refere-se a tanto um processo natural como artificial pelo que genes de uma espécie, variedade ou cultivar são movimentados no genoma de outra espécie, variedade ou cultivar, por cruzamento destas espécies. O processo pode opcionalmente ser completado por retrocruzamento para o parental recorrente.

10 "Engenharia genética", "transformação" e "modificação genética" são todos usados aqui como sinônimos para a transferência de genes isolados e clonados no DNA, geralmente o DNA cromossômico ou genoma, de outro organismo.

15 Os termos "resistente" e "resistência" englobam tanto resistência parcial como completa a infecção. Uma planta de melão suscetível a CYSDV pode ser ou não resistente ou ter níveis baixos de resistência a informação por CYSDV.

20 Como usado aqui o termo "parte de planta" indica uma parte da planta de melão, incluindo células únicas e tecidos de células como células de planta que são intactas em plantas, grupamentos de células e culturas de tecidos das quais as plantas de melão podem ser regeneradas. Os exemplos de partes de plantas incluem, mas não são limitados a células únicas e tecidos de pólen, óvulos, folhas, embriões, raízes, pontas de raízes, flores, anteros, frutas, brotos, caules, e sementes; assim como pólen, óvulos, folhas, 25 embriões, raízes, pontas de raízes, anteros, flores, frutas, caules, brotos, rebentos, cargas de raiz, sementes, protoplastos, calos, e outros.

Como usado aqui o termo "população" significa uma coleção geneticamente heterogênea de plantas compartilhando uma derivação genética comum.

Como usado aqui o termo "variedade cultivada" ou "cultivar" significa um grupo de plantas similares que por aspectos estruturais ou genéticos e/ou desempenho podem ser distintas de outras variedades cultivadas dentro da mesma espécie. O termo "variedade" sem qualquer indicação específica pode fazer referência a tanto uma variedade botânica como cultivada, e ou para uma dependendo do contexto.

O termo "QTL" é usado aqui em seu significado reconhecido na arte. O termo "QTL associado com resistência a CYSDV em melão" assim como a abreviatura "QTL para resistência a CYSDV" faz referência a uma região localizada em um cromossomo particular de melão que é associado com pelo menos um gene que codifica para resistência a CYSDV ou pelo menos uma região regulatória, isto é, uma região de um cromossomo que controla a expressão de um ou mais genes envolvidos na resistência a CYSDV. A expressão fenotípica deste gene pode por exemplo ser observada como uma taxa reduzida de replicação viral e/ou uma taxa reduzida de movimento viral através da planta. Um QTL pode por exemplo compreender um ou mais genes dos quais os produtos conferem a resistência genética. Alternativamente, um QTL pode, por exemplo, compreender genes regulatórios ou seqüências das quais os produtos influenciam a expressão de genes em outros *loci* no genoma da planta assim conferindo a resistência a CYSDV. O QTL da presente invenção (QTL -1) pode ser definido por indicação de seu local genético no genoma do acesso *Cucumis* selvagem respectivo usando um ou mais marcadores genômicos moleculares. Um ou mais marcadores, por sua vez, indica um local específico. As distâncias entre os *loci* são geralmente medidas por freqüência de cruzamento entre os *loci* no mesmo cromossomo e expressados como centimorgano. Os mais afastados que os dois *loci* estão, o mais provavelmente que o cruzamento irá ocorrer entre os mesmos. Inversamente, se dois *loci* estiverem próximos, um cruzamento é menos provável de ocorrer entre os mesmos. Como uma regra,

um centimorgano (função de mapa de Kosambi (cM)) é aproximadamente igual a 1% de recombinação entre *loci* (marcadores) (Lui, 1997). Quando um QTL pode ser indicado por múltiplos marcadores, a distância genética entre os marcadores de ponto final é indicativa do tamanho do QTL.

5 O termo "planta de melão recipiente suscetível a CYSDV" é usado aqui para indicar uma planta de melão que deve receber DNA obtido de uma planta de melão doadora que compreende um QTL para resistência a CYSDV. Referida "planta de melão recombinante suscetível a CYSDV" pode ou não já compreender um ou mais QTLs para resistência a CYSDV, em cujo
10 caso o termo indica uma planta que deve receber um QTL adicional.

O termo "fundo genético natural" é usado aqui para indicar o antecedente genético original de um QTL. Este antecedente é o genoma de melão acesso PI313970. Assim, o melão acesso PI313970 representa o antecedente genético natural do QTL da invenção. Inversamente, um método
15 que envolve a transferência de DNA compreendendo o QTL, ou uma parte conferindo resistência do mesmo, a partir do cromossomo LG6 de melão acesso PI313970 para a mesma posição no cromossomo correspondente de outra espécie de melão, irá resultar em que referido QTL, ou parte conferindo
resistência do mesmo, não estando em seu antecedente genético natural.

20 Como usado aqui o termo "grupo de ligação" refere-se a todos os genes ou traços genéticos que estão localizados no mesmo cromossomo. Dentro do grupo de ligação, os *loci* que estão próximo o suficiente juntos irão demonstrar ligação em cruzamentos genéticos. Porque a probabilidade de troca genética aumenta com a distância física entre genes em um
25 cromossomo, os genes cujos locais estão distantes removidos um do outro dentro de um grupo de ligação podem não demonstrar qualquer ligação detectável em testes genéticos diretos. O termo "grupo de ligação" é principalmente usado para fazer referência a *loci* genéticos que demonstram um comportamento ligado em sistemas genéticos onde as designações de

cromossomos não foram ainda feitas. Assim, no presente contexto, o termo "grupo de ligação" é sinônimo para (a entidade física de) cromossomo.

Como usado aqui o termo "marcador molecular" refere-se a um indicador que é usado em métodos para a visualização de diferenças nas características de seqüências de ácido nucleico. Os exemplos destes indicadores são marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), polimorfismos de nucleotídeo único, (SNPs), mutações de inserção, marcadores de microsatélite, regiões amplificadas caracterizadas por seqüência (SCARs), marcadores de seqüência polimórfica amplificada clivada (CAPS), ou marcadores de isozimas ou combinações dos marcadores descritos aqui, que definem um local cromossômico e genético específico. Um "marcador molecular ligado a um QTL" como definido aqui pode assim fazer referência a SNPs, mutações de inserção assim como marcadores AFLP mais comuns ou qualquer outro tipo de marcador usado no campo. No contexto de marcadores de AFLP, nomeados aqui, os marcadores indicam uma seqüência de DNA específica de melão flanqueada por dois iniciadores de AFLP, cujos iniciadores consistem de "iniciadores de núcleo" E e M, correspondendo com os sítios de restrição das enzimas de restrição EcoRI e MseI, (Vos et al., 1995; Bai et al. 2003), cada seguido por um código de dois dígitos identificando os nucleotídeos seletivos pelos quais o "iniciador de núcleo" é estendido (11: AA; 14: AT; 48: CAC; 49: CAG; 50: CAT; 51: CCA; 54: CCT; 57: CGG; 60: CTC). E11/M49-239 representa um marcador obtido usando os iniciadores de amplificação EcoRI + AA e MseI + CAG para produzir um fragmento tendo um comprimento total de 239 bp, que é o tamanho aproximado de fragmento polimórfico resultante (tamanho dado \pm 1-2 pares de bases). O tamanho é normalmente arredondado, mas pode também ser dado em décimos. O comprimento do fragmento pode depender do método usado para detectar o fragmento, e é uma aproximação de seu

comprimento verdadeiro.

O termo "seqüência de DNA específica de melão" indica uma seqüência de polinucleotídeos tendo uma homologia de seqüência de nucleotídeos de mais que 80%, preferivelmente mais que 85%, mais preferivelmente mais que 90%, ainda mais preferivelmente mais que 95%, ainda mais preferivelmente mais que 97%, mais preferivelmente mais que 99% com uma seqüência do genoma da espécie *Cucumis melo* que mostra a maior similaridade para a mesma, preferivelmente no caso de marcadores para o QTL da presente invenção, a parte da seqüência de DNA de melão acesso PI313970 flanqueando os marcadores QTL-1.

O termo "homologia de seqüência de nucleotídeo" como usado aqui denota a presença de homologia entre dois polinucleotídeos. Os polinucleotídeos tem seqüências "homólogas" se a seqüência de nucleotídeos nas duas seqüências for igual quando alinhada para correspondência máxima. A comparação de seqüências entre dois ou mais polinucleotídeos é geralmente realizada por comparação de porções das duas seqüências sobre uma janela de comparação para identificar e comparar regiões locais de similaridade de seqüência. A janela de comparação é geralmente de cerca de 20 a 200 nucleotídeos contíguos. A "porcentagem de homologia de seqüência" para polinucleotídeos, como 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 ou 100 homologia de seqüência percentual pode ser determinada por comparação de duas seqüências otimamente alinhadas sobre uma janela de comparação, em que a porção da seqüência de polinucleotídeos na janela de comparação pode incluir adições ou deleções (isto é, espaços), como comparado com a seqüência de referência (que não compreende adições ou deleções) para alinhamento ótimo das duas seqüências. A porcentagem é calculada por (a) determinação do número de posições em que a base de ácido nucleico idêntica ocorre em ambas as seqüências para dar o número de posições correspondidas; (b) divisão do número de posições correspondidas pelo número total de posições

na janela de comparação, e (c) multiplicação do resultado por 100 para dar a porcentagem de homologia de seqüência. O alinhamento ótimo de seqüências para comparação pode ser conduzido por implementações computadorizadas de algoritmos conhecidos, ou por inspeção visual. A comparação de seqüência prontamente disponível e algoritmos de alinhamento de seqüência múltiplos são, respectivamente, a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997) e programas ClustalW, ambos disponíveis na internet. Outros programas apropriados incluem mas não são limitados a GAP, BestFit, PlotSimilarity, e FASTA no pacote de Software Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, USA) (Devereux et al., 1984).

Um local de traço quantitativo (QTL) associado com resistência a closterovírus de acordo com a presente invenção foi primeiro observado em uma planta de melão acesso PI313970. Quando da análise de AFLP, e mapeamento do intervalo de um número grande de marcadores de AFLP no genoma de cruzamento s entre cultivares de melão PI313970 e comerciais, o QTL conferindo resistência a closterovírus foi verificado como estando associado com 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 e/ou E11/M49-072, e verificou-se estar localizado no cromossomo equivalente do grupo de ligação (LG) 6 em uma região se estendendo em cerca de 1,9 a cerca de 17,2 cM.

Os marcadores identificados aqui podem ser usados em vários aspectos da invenção como será agora ilustrado. Aspectos da invenção não são limitados ao uso dos marcadores aqui identificados. É enfatizado que os aspectos também podem fazer uso de marcadores não explicitamente descritos aqui ou mesmo ainda a serem identificados. Além do "gene" de unidade genética, em que a expressão fenotípica depende em um grande número de fatores que não podem ser previstos, a unidade genética "QTL"

denota uma região no genoma que está diretamente relacionada com o traço quantificável fenotípico. Assim, apesar dos genes *per se* conterem pouca ou nenhuma relação com a reprodução de plantas, um QTL está diretamente aplicável à reprodução de planta. Agora, que nenhum QTL para resistência a closterovírus em melão tinha sido conhecido antes do depósito do presente pedido, segue-se que não se encontra aplicação industrial dos genes de resistência a closterovírus em métodos para a reprodução de plantas. Os presentes inventores agora descobriram um QTL para resistência a closterovírus em melão que é transportado para as plantas descendentes. Os inventores realizaram esta descoberta por observação de que a presença de uma fileira de marcadores genômicos contíguos pertencendo ao grupo de ligação 6, isto é, em um único cromossomo no genoma de melão correlacionado com a presença de um traço fenotípico particular que afetou a ocorrência de sintomas de doença após a exposição a uma quantidade infecciosa de partículas virais de closterovírus nestes melões e eles demonstraram que esta região genômica era herdada de acordo com as leis mendelianas normais de herança.

O QTL primeiro identificado pelos presentes inventores está localizado em cromossomo identificado aqui como grupo de ligação 6 e seu local é melhor caracterizado por vários outros marcadores arbitrários. Nas presentes investigações, marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) foram usados, apesar de marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), marcadores de microssatélite (por exemplo SSRs), marcadores de região amplificada caracterizada na seqüência (SCAR), marcadores de seqüência polimórfica amplificada clivada (CAPS) ou marcadores de isozima ou combinações destes marcadores poderem também ser usados. Em geral, um QTL pode se estender de uma região de vários milhões de bases. Assim, provendo a informação de

seqüência completa para o QTL é praticamente impossível mas também desnecessário, como o modo em que o QTL é primeiro detectado - apesar da correlação observada entre a presença de uma fileira de marcadores genômicos contíguos e a presença de um traço fenotípico particular - permitir traçar dentre as plantas da descendência as plantas que tem o potencial genético para demonstrar um traço fenotípico particular. Ao prover uma listagem não limitativa de marcadores, a presente invenção assim provê a utilidade efetiva de QTL em um programa de reprodução.

O QTL como descrito aqui foi encontrado por cruzamento de *Cucumis melo* var. *agrestis* (PI 319370) com *C melo* var. *reticulatis* (galia) e triagem para resistência a CYSDV usando um bioteste convencional (teste no campo sob pressão de CYSDV natural). Os escores LOD para marcadores de AFLP significativamente maiores do que 3 foram considerados como indicando o QTL.

Um marcador é específico para uma linhagem particular de reprodução. Assim, um traço específico é associado com um marcador particular. Os marcadores como indicado no presente pedido não somente indicam o local do QTL, eles também estão correlacionados com a presença do traço fenotípico específico em uma planta. É importante notar que os marcadores genômicos contíguos que indicam o local do QTL no genoma são em principio arbitrários ou não limitativos. Em geral, o local de um QTL é indicado por uma fileira contígua de marcadores que demonstram uma correlação estatística para o traço fenotípico. Uma vez que um marcador é encontrado fora da fileira (isto é, um que tem um escore LOD abaixo de um limite determinado, indicando que o marcador é tão remoto que e recombinação na região entre este marcador e o QTL ocorre com tanta freqüência que a presença do marcador não está correlacionada em um modo estatisticamente significante com a presença do fenótipo) os limites do QTL são fixados. Assim, é também possível indicar o local do QTL por outros

marcadores localizados dentro desta região especificada.

É ainda importante notar que os marcadores genômicos contíguos podem ser também usados para indicar a presença do QTL (e assim o fenótipo) em uma planta individual, isto é, podem ser usados em procedimentos de seleção auxiliada por marcador (MAS). Em princípio, o número de marcadores potencialmente utilizáveis é limitado, mas pode ser muito grande, e o versado na técnica pode facilmente identificar marcadores adicionais aos acima mencionados no presente pedido. Qualquer marcador que é ligado ao QTL, por exemplo estando dentro dos limites físicos da região genômica se estendendo pelos marcadores tendo escores LOD estabelecidos acima de um determinado limiar, assim indicando que nenhuma ou uma recombinação muito pequena entre o marcador e o QTL ocorre em cruzamentos, assim como qualquer marcador em desequilíbrio de ligação para o QTL; assim como marcadores que representam as mutações causais reais dentro do QTL, podem ser usados em procedimentos MAS. Isto significa que os marcadores identificados no pedido como associados com o QTL, como o marcador AFLP E11/M49-239, são apenas exemplos de marcadores apropriados para uso em procedimentos MAS. Além disso, quando o QTL, ou a parte conferindo traço específico do mesmo, é introgridido em outro antecedente genético (isto é, no genoma de outra espécie de planta), então alguns marcadores podem não ser mais encontrados na descendência apesar do traço estar presente aí, indicando que estes marcadores estão fora da região genômica que representa a parte conferindo traço específico do QTL, na linhagem parental original somente que o novo antecedente genético tem uma organização genômica diferente.

Assim, um método para produzir uma planta da presente invenção compreendendo introgridir em uma planta de melão suscetível a closterovírus o QTL conferindo resistência a closterovírus do melão acesso PI313970, e envolvendo procedimentos MAS, não é limitado ao uso de

marcadores que são providos aqui para o único fim de (grosseiramente) indicar a localização do QTL no cromossomo. O versado sabe que outros marcadores podem prover pelo menos utilidade igual em tais procedimentos MAS.

5 A mutação causal do QTL, isto é, uma mutação no DNA compreendido no QTL, que por exemplo resulta em uma mudança em uma seqüência de codificação de proteína ou afeta a expressão de um gene em um modo que leva ao fenótipo observado, não é sempre identificada. Isto não tem, por si, no entanto, conseqüência à invenção porque muitos marcadores
10 associados com o QTL e presentes na planta triada indica a presença da mutação causal nesta planta.

 Porque testes de doença confiáveis e reprodutíveis que poderiam permitir a identificação e a localização de material genético responsável por conferir a resistência a closterovírus são consumidores de
15 tempo, o uso de marcadores ligados ao QTL identificado aqui irão ajudar na reprodução para a resistência a closterovírus em melão.

 A seqüência de ácido nucleico de um QTL da presente invenção pode ser determinada por métodos bem conhecidos do versado. Por exemplo, uma seqüência de ácido nucleico compreendendo referido QTL ou
20 uma parte conferindo resistência do mesmo pode ser isolada de uma planta doadora resistente a closterovírus por fragmentação do genoma de referida planta e selecionando estes fragmentos abrigando um ou mais marcadores indicativos de referido QTL. Subseqüentemente, ou alternativamente, as seqüências de marcador (ou partes da mesma) indicativos de referido QTL
25 podem ser usadas como iniciadores de amplificação (PCR), a fim de amplificar uma seqüência de ácido nucleico compreendendo referido QTL de uma amostra de ácido nucleico genômica ou um fragmento de genoma obtido da referida planta. A seqüência amplificada pode então ser purificada a fim de obter o QTL isolado. A seqüência de nucleotídeo do QTL e/ou de quaisquer

marcadores adicionais compostos aqui pode então ser obtida por métodos de seqüenciamento padrões.

5 A presente invenção assim também se refere a uma seqüência de ácido nucleico isolada (preferivelmente DNA) que compreende um QTL da presente invenção, ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo. Assim, os marcadores que aponta os vários QTLs descritos aqui podem ser usados para a identificação, isolamento e purificação de um ou mais genes de melão que codificam a resistência a closterovírus.

10 A seqüência de nucleotídeos de um QTL da presente invenção pode por exemplo também ser resolvida por determinação da seqüência de nucleotídeo de um ou mais marcadores associados com referido QTL e projetando iniciadores internos para referidas seqüências de marcador que podem então ser usadas para ainda determinar a seqüência de QTL fora de referidas seqüências de marcador. Por exemplo, a seqüência de nucleotídeos dos marcadores AFLP identificados aqui pode ser obtida por isolamento dos referidos marcadores do gel de eletroforese usado na determinação da presença de referidos marcadores no genoma de uma planta sujeito, e determinação da seqüência de nucleotídeo de referidos marcadores por exemplo métodos de terminação de cadeia dideóxi, bem conhecidos na arte.

20 Em formas de realização de tais métodos para a detecção da presença de um QTL, em uma planta de melão resistente a closterovírus suspeita, o método também pode compreender as etapas de prover um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo capaz de hibridizar sob condições de hibridização estringentes para uma seqüência de ácido nucleico de um marcador ligado ao referido QTL, preferivelmente selecionado dentre marcadores identificados aqui como sendo ligados ao referido QTL, contatar referido oligonucleotídeo ou polinucleotídeo com um ácido nucleico genômico de uma planta de melão resistente a closterovírus suspeita, e determinar a presença de hibridização específica de referido oligonucleotídeo

25

ou polinucleotídeo para referido ácido nucleico genômico. Preferivelmente, referido método é realizado em uma amostra de ácido nucleico obtida a partir de referida planta de melão resistente a closterovírus suspeita, apesar de métodos de hibridização in situ poderem ser também empregados.

5 Alternativamente, e em uma forma de realização mais preferida, o versado na arte pode, uma vez que a seqüência de nucleotídeo de QTL foi determinada, projetar sondas de hibridização específicas ou oligonucleotídeos capazes de hibridizar sob condições de hibridização estringentes para a seqüência de ácido nucleico de referido QTL, e pode usar estas sondas de hibridização em
10 métodos para detectar a presença de um QTL da invenção em uma planta de melão resistente a closterovírus suspeita.

A expressão "condições de hibridização estringentes" refere-se a condições sob as quais uma sonda ou polinucleotídeo irá hibridizar para sua sub-seqüência alvo, tipicamente em uma mistura complexa de ácidos
15 nucleicos, mas não essencialmente outras seqüências. As condições estringentes são dependentes da seqüência e serão diferentes em circunstâncias diferentes. As seqüências mais longas hibridizam especificamente em maiores temperaturas. Um guia extenso para a hibridização de ácido nucleico é encontrado em Tijssen (Tijssen, 1993). Em
20 geral, as condições estringentes são selecionadas como sendo cerca de 5-10°C menores do que o ponto de fusão térmica (T_m) para a seqüência específica em um pH de resistência iônica definida,. O T_m é a temperatura (sob resistência iônica definida), pH, e a concentração de ácido nucleico) em que 50% das sondas complementares ao alvo hibridizam na seqüência de alvo em
25 equilíbrio (como as seqüências alvo estão presentes em excesso, a T_m , 50% das sondas são ocupadas em equilíbrio). As condições estringentes serão as em que a concentração de sal é menor do que cerca de 1,0 M íon sódio, tipicamente cerca de 0,01 a 1,0 M concentração de íon sódio (ou outros sais), a pH 7,0 a 8,3, e a temperatura está pelo menos cerca de 30 °C para sondas

curtas (por exemplo 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60 °C para sondas longas (por exemplo maiores do que 50 nucleotídeos). As condições estridentes também podem ser obtidas com a adição de agentes desestabilizantes como formamida. Para hibridização seletiva ou específica, um sinal positivo é pelo menos duas vezes a hibridização de fundo, preferivelmente 10 vezes a hibridização de fundo. AS condições de hibridização estridentes exemplares são com frequência: 50% formamida, 5xSSC, e 1% SDS, incubando a 42 °C, ou 5xSSC, 1% SDS, incubando a 65°C, com lavagem em 0,2xSSC, e 0.1% SDS a 65 °C. Para PCR, uma temperatura de cerca de 36 °C é típica para amplificação de baixa estringência, apesar de temperaturas de anelamento poderem variar entre cerca de 32 °C e 48 °C dependendo do comprimento do iniciador. As diretrizes adicionais para a determinação dos parâmetros de hibridização são providas em numerosas referências, por exemplo Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel, et al. 1995).

"Ácido nucleico" ou "oligonucleotídeo" ou "polinucleotídeo" ou equivalentes gramaticais usado aqui significam pelo menos dois nucleotídeos covalentemente ligados juntos. Os oligonucleotídeos tem tipicamente de cerca de 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18 20 25, 30, 40, 50 ou até cerca de 100 nucleotídeos em comprimento. Os ácidos nucleicos e polinucleotídeos são polímeros de qualquer comprimento, incluindo comprimentos mais longos, por exemplo 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10.000, etc. Um ácido nucleico da presente invenção irá geralmente conter ligações fosfodiéster, apesar de em alguns casos, análogos de ácido nucleico serem incluídos que podem ter estruturas dorsais alternadas, compreendendo, por exemplo ligações fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, ou O-metilfoforoamidito (ver Eckstein, 1991), e estruturas dorsais de peptídeo ácido nucleico e ligações. As misturas de ácidos nucleicos de ocorrência natural e análogos podem ser usadas. Os análogos particularmente preferidos

para oligonucleotídeos são peptídeo ácidos nucleicos (PNA).

Produção de plantas de melão resistentes a closterovírus por métodos transgênicos

5 Uma planta de melão resistente a closterovírus, ou parte da
mesma, de acordo com a presente invenção compreende em seu genoma, um
QTL associado com resistência a closterovírus, ou uma parte conferindo
resistência a closterovírus do mesmo, como aqui definido acima, e derivado
de melão acesso PI313970 em que referido QTL ou referida parte conferindo
10 resistência a closterovírus do mesmo não está em seu antecedente genético
natural. Esta planta pode ser obtida usando vários métodos bem conhecidos na
técnica, ou transgênicas ou não transgênicas.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, uma
seqüência de ácido nucleico (preferivelmente DNA) compreendendo o QTL
da presente invenção ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do
15 mesmo, pode ser usada para a produção de uma planta de melão resistente a
closterovírus. Neste aspecto, a invenção provê o uso de um QTL da presente
invenção ou partes conferindo resistência a closterovírus do mesmo, para
produzir uma planta de melão resistente a closterovírus, cujo uso envolve a
introdução de uma seqüência de ácido nucleico compreendendo referido QTL
20 em uma planta de melão recipiente suscetível a closterovírus. Como descrito,
referida seqüência de ácido nucleico pode ser derivada de uma planta de
melão doadora resistente a closterovírus apropriada. Uma planta de melão
doadora resistente a closterovírus apropriada capaz de prover uma seqüência
de ácido nucleico compreendendo o QTL acima descrito, ou parte conferindo
25 resistência a closterovírus do mesmo, é *Cucumis melo*, acesso PI313970.
Outras plantas de melão relacionadas, que demonstram resistência a
closterovírus e compreendem um ou mais genes que codificam para
resistência a closterovírus podem ser também usadas como plantas doadoras
de resistência a closterovírus como a presente invenção descreve como este

material pode ser identificado. Outros acessos a *Cucumis melo* podem ser examinados para resistência a closterovírus outro por uso de triagens de biotestes ou por uso de procedimentos MAS com um marcador específico para o QTL, descrito aqui.

5 Um QTL da presente invenção foi primeiro descoberto em *Cucumis melo*, acesso PI312970, no entanto, também outro acesso a melão pode ser triado para a presença deste QTL. Uma vez identificada em uma planta de melão doadora apropriada, a seqüência de ácido nucleico que compreende um QTL para resistência a closterovírus de acordo com a
10 presente invenção, ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo, pode ser transferida a uma planta recipiente apropriada por qualquer método disponível. Por exemplo, a referida seqüência de ácido nucleico pode ser transferida por cruzamento de uma planta de melão doadora de resistência a closterovírus com uma planta de melão recipiente suscetível ou mesmo uma
15 planta de outro gênero (isto é, por introgressão), por transformação, por fusão de protoplasto, por uma técnica de haplóide duplicado, ou por resgate de embrião, ou qualquer outro sistema de transferência de ácido nucleico, opcionalmente seguido por seleção de plantas descendentes compreendendo o QTL, e demonstrando resistência a closterovírus. Para métodos transgênicos
20 de transferência, uma seqüência de ácido nucleico compreendendo um QTL para resistência a closterovírus de acordo com a presente invenção, ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo, pode ser isolada da referida planta doadora por uso de métodos bem conhecidos na técnica e assim a seqüência de ácido nucleico isolado pode ser transferida para a planta
25 recipiente por métodos transgênicos, por exemplo por meio de um vetor, em um gameta, ou em qualquer outro elemento de transferência apropriado, como partícula balística revestida com referida seqüência de ácido nucleico.

A transformação da planta geralmente envolve a construção de um vetor de expressão que irá funcionar em células de planta. Na presente

invenção, este vetor compreende uma seqüência de ácido nucleico que compreende um QTL, para resistência a closterovírus da presente invenção, ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo, cujo vetor pode compreender um gene conferindo resistência a closterovírus que está sob
5 controle de ou ligado operativamente a um elemento regulador, como um promotor. A expressão vetor pode conter uma ou mais das combinações de gene ligado operativamente / elemento regulador, desde que pelo menos um dos genes contidos nas combinações codifique para resistência a closterovírus. O(s) vetor(es) pode estar na forma de um plasmídeo, e pode ser
10 usado, sozinho ou em combinação como outros plasmídeos, em um método para produzir plantas transgênicas que são resistentes a closterovírus, usando métodos de transformação conhecidos na técnica como sistema de transformação de *Agrobacterium*.

Os vetores de expressão podem incluir pelo menos um gene
15 marcador (repórter), ligado operativamente a um elemento regulatório (como um promotor), que permite que células transformadas contendo o marcador sejam ou recuperadas por seleção negativa (por inibição do crescimento de células que não contém o gene marcador selecionável) ou por seleção positiva (por triagem par o produto codificado pelo gene marcador) Muitos
20 genes de marcador selecionável comumente usados para transformação de plantas são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, genes que codificam para enzimas que destoxificam metabolicamente um agente químico seletivo que pode ser um antibiótico ou um herbicida, ou genes que codificam um alvo alterado que é insensível ao inibidor. Vários métodos de
25 seleção positivos são conhecidos na arte, como seleção de mannose. Alternativamente, a transformação menos alvo pode ser usada para obter plantas sem genes marcadores mencionados, a técnica para isto sendo conhecida na arte.

Um método para a introdução de um vetor de expressão em

uma planta é baseado no sistema de transformação natural de *Agrobacterium* (ver por exemplo Horsch et al., 1985). *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* são bactérias de solo patogênicas de planta que transformam geneticamente as células de plantas. Os plasmídeos Ti e Ri de *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, respectivamente, transportam genes responsáveis por transformação genética da planta (ver por exemplo Kado, 1991). Os métodos de introdução de vetores de expressão em tecido de planta incluem a infecção direta ou co-cultivo de células de planta com *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch et al., 1985). As descrições de sistemas de vetores de *Agrobacterium* e métodos para transferência de genes mediada por *Agrobacterium* são providos por Gruber e Crosby, 1993 e Moloney et al., 1989. Ver também, Pat. U. S. No. 5.591.616. Várias descrições de vetores de expressão de plantas e genes repórter e protocolos de transformação e descrições de sistemas de vetor de *Agrobacterium* e métodos para a transferência de genes mediada por *Agrobacterium* podem ser encontrados em Gruber e Crosby, 1993. Vários métodos de cultivo de tecidos de plantas são providos por exemplo por Miki et al., 1993 e por Phillips, et al., 1988. Um livro de referência apropriado para as técnicas de clonagem molecular e vetores de expressão apropriados é o do Sambrook e Russell (2001).

Outro método para a introdução de um vetor de expressão em uma planta é baseado em transformação mediada por microprojéteis em que DNA é transportado na superfície de microprojéteis. O vetor de expressão é introduzido em tecidos de plantas com um dispositivo biolístico que acelera os microprojéteis a velocidades de 300 a 600 m/s que é suficiente para penetrar nas paredes e membranas de células de plantas (Ver, Sanford et al., 1987, 1993; Sanford, 1988, 1990; Klein et al., 1988, 1992). Outro método para a introdução de DNA em plantas é via a sonicação de células alvos ((ver Zhang et al., 1991). Alternativamente, lipossomas ou fusão de esferoplastos foram usados para introduzir vetores de expressão em plantas (ver por

exemplo Deshayes et al., 1985 e Christou et al., 1987). A absorção direta de DNA em protoplastos usando precipitação de CaCl_2 , álcool polivinílico ou poli-L- ornitina foi também registrada (ver por exemplo, Hain et al. 1985 e Draper et al., 1982). A eletroporação de protoplastos e células e tecidos completos foi também descrita (D'Halluin et al., 1992 e Laursen et al., 1994).

Após transformação de tecidos alvos de melão, a expressão dos genes de marcador selecionável acima mencionada permite uma seleção preferencial de células, tecidos e/ou plantas transformados, usando métodos de regeneração e seleção agora bem conhecidos na técnica. Os marcadores de AFLP como aqui identificados podem ser também usados para este fim.

Produção de plantas de melão resistentes a closterovírus por métodos não transgênicos

Em uma forma de realização alternativa para produzir uma planta de melão resistente a closterovírus, fusão de protoplastos pode ser usada para a transferência de ácidos nucleicos de uma planta doadora para uma planta recipiente. A fusão de protoplastos é uma união induzida ou espontânea, como uma hibridização somática, entre dois ou mais protoplastos (células das quais as paredes de células são removidas por tratamento enzimático) para produzir uma célula única bi- ou multi- nucleada. A célula fundida, que pode mesmo ser obtida com espécies de planta que não podem ser inter-reproduzidas na natureza, é cultivada em tecido em uma planta híbrida demonstrando a combinação desejável de traços. Mais especificamente, um primeiro protoplasto pode ser obtido de uma planta de melão ou de outra linhagem de planta que demonstra resistência a infecção por closterovírus. Um segundo protoplasto pode ser obtido de um segundo melão ou outra linhagem de planta, preferivelmente uma linhagem de melão que compreende características comercialmente valiosas, como, mas não limitados a resistência à doença, resistência a insetos, características valiosas de frutas, etc. Os protoplastos são então fundidos usando procedimentos de

fusão de protoplastos tradicionais, que são conhecidos na técnica.

Alternativamente, o resgate de embriões pode ser empregado na transferência de um ácido nucleico compreendendo um ou mais QTLs como descrito aqui de uma planta doadora para uma planta recipiente. O resgate dos embriões pode ser usado como um procedimento para isolar embriões dos cruzamentos em que as plantas deixam de produzir semente viável. Neste processo, o ovário fertilizado ou semente imatura de uma planta é cultivada em tecido para criar novas plantas. (Pierik 1999).

A presente invenção também refere-se a um método de produção de uma planta de melão resistente a closterovírus compreendendo as etapas de realizar um método para a detecção da presença de um local de resistência quantitativa (QTL) associado com resistência a closterovírus em uma planta de melão doadora de acordo com a invenção como descrito acima, e transferir uma seqüência de ácido nucleico compreendendo pelo menos um QTL assim detectado, ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo, da referida planta doadora para uma planta de melão recipiente suscetível a closterovírus. A transferência da referida seqüência de ácido nucleico pode ser realizada por qualquer um dos métodos previamente descritos aqui.

Uma forma de realização preferida deste método compreende a transferência por introgessão de referida seqüência de ácido nucleico de uma planta de melão doadora resistente a closterovírus em uma planta de melão recipiente suscetível a closterovírus por cruzamento de referidas plantas. Esta transferência pode assim ser obtida de modo apropriado usando técnicas de reprodução tradicionais. QTLs são preferivelmente introgredidos em linhagens de melão comerciais usando reprodução auxiliada por marcador (MAS). A reprodução auxiliada por marcador ou seleção auxiliada por marcador envolve o uso de um ou mais dos marcadores moleculares para a identificação e seleção destas plantas descendentes que contém um ou mais

dos genes que codificam para o traço desejado. No presente caso, esta identificação e seleção é baseada em seleção de QTLs da presente invenção ou marcadores associados. MAS também pode ser usado para desenvolver linhagens quase - isogênicas (NIL) abrigoando o QTL de interesse, deixando
5 um estudo mais detalhado de cada efeito de QTL e também é um método efetivo para o desenvolvimento de populações de linhagem endogâmica retrocruzada (BIL) (ver por exemplo Nesbitt et al., 2001; van Berloo et al., 2001). As plantas de melão desenvolvidas de acordo com esta forma de realização podem derivar com vantagem uma maior parte de seus traços da
10 planta recipiente, e derivar resistência a closterovírus da planta doadora.

Como discutido brevemente acima, as técnicas de reprodução tradicionais podem ser usadas para introgridir uma seqüência de ácido nucleico codificando para resistência a closterovírus em uma planta de melão recipiente suscetível a closterovírus. Em um método, que é referido como
15 uma reprodução com pedigree, uma planta de melão doadora que demonstra resistência a closterovírus e compreendendo uma seqüência de ácido nucleico codificando para resistência a closterovírus é cruzada com uma planta de melão recipiente suscetível a closterovírus que preferivelmente demonstra características comercialmente desejáveis, como, mas não limitado a,
20 resistência a doença, resistência a inseto, características de frutas valiosas, etc. A população de plantas resultante (representando os híbridos F_1) é então autofertilizada e produziu sementes (sementes F_2). As plantas F_2 cultivadas a partir das sementes F_2 são então triadas para resistência a closterovírus. A população pode ser triada em vários modos diferentes.

25 Primeiro a população pode ser triada usando uma triagem de doença tradicional. Estas triagens de doença são bem conhecidas na arte. Preferivelmente, um bioteste quantitativo é usado. Segundo, a seleção auxiliada por marcador pode ser realizada usando um ou mais dos marcadores moleculares acima descritos para identificar as progênies que compreendem

uma seqüência de ácido nucleico codificando para resistência a closterovírus. Outros métodos, referidos acima por métodos para a detecção da presença de um QTL podem ser usados. Também, a seleção auxiliada por marcador pode ser usada para confirmar os resultados obtidos dos biotestes quantitativos, e assim vários métodos podem ser usados em combinação.

5 As linhagens de planta de melão resistentes a closterovírus endogâmicas podem ser desenvolvidas usando as técnicas de seleção recorrente e retrocruzamento, autofertilização e/ou di-haplóides, ou qualquer outra técnica usada para fazer linhagens parentais. Em um método de seleção e retrocruzamento recorrentes, a resistência a closterovírus pode ser 10 introgrida em uma planta recipiente alvo (o parental recorrente) por cruzamento do parental recorrente com uma primeira planta doadora, que diferente do parental recorrente e é referida aqui como o "parental não recorrente". O parental recorrente é uma planta que não é resistente e tem um 15 baixo nível de resistência a closterovírus e possui características comercialmente desejáveis, como mas não limitado a (adicionais) resistência a doença, resistência a insetos, características de frutas valiosas, etc. O parental não recorrente demonstra resistência a closterovírus e compreende uma seqüência de ácido nucleico que codifica para resistência a closterovírus. 20 O parental não recorrente pode ser qualquer variedade de planta ou linhagem endogâmica que é fértil cruzada com o parental recorrente. As progênes resultantes de um cruzamento entre o parental recorrente e o parental não são retrocruzadas para o parental recorrente. A população de plantas resultante é então triada para as características desejadas, cuja triagem pode ocorrer em 25 vários modos diferentes. Por exemplo, a população pode ser triada usando triagens de patologia fenotípica ou biotestes quantitativos como bem conhecido na técnica. Alternativamente, em vez de usar biotestes, a seleção auxiliada por marcador (MAS) pode ser realizada usando um ou mais dos marcadores moleculares acima mencionados., sondas de hibridização ou

polinucleotídeos para identificar a progênie que compreende uma seqüência de ácido nucleico codificando para resistência a closterovírus. Também, MAS pode ser usado para confirmar os resultados obtidos dos biotestes quantitativos. No caso em que QTL está localizado em um local recessivo, isto significa que o gene de resistência não pode ser triado em uma população F_1 ou BC_1 por uso de triagens fenotípicas como biotestes de resistência. Os marcadores aqui definidos são assim por fim apropriados para selecionar plantas descendentes apropriadas por triagem genotípica.

Após a triagem, as plantas híbridas F_1 que demonstram um fenótipo resistente a closterovírus ou, mais preferivelmente, genótipo e assim compreendem a seqüência de ácido nucleico requerida codificando para resistência a closterovírus são então selecionadas e retrocruzadas para o parental recorrente por várias gerações a fim de permitir que a planta de melão se torne cada vez mais endogâmica. Este processo pode ser realizado por duas a cinco ou mais gerações. Em princípio, as progênies resultantes do processo de cruzamento do parental recorrente com o parental não recorrente de resistência a closterovírus são heterozigóticas para um ou mais genes que codificam para resistência a closterovírus.

Deve-se lembrar que, por exemplo quando introgridindo um local recessivo, o fenótipo resistente irá somente ocorrer em plantas descendentes sob condições em que as plantas homozigóticas possam ser formadas.

Em geral, um método de introdução de um traço desejado em uma variedade de melão híbrido compreende as etapas de:

(a) cruzar um parental de melão endogâmico com outra planta de melão que compreende um ou mais traços desejados, para produzir plantas de progênie F_1 , em que o traço desejado é selecionado dentre o grupo consistindo de resistência a closterovírus - resistência;

(b) selecionar as referidas plantas de progênie F' que tem o

traço desejado para produzir plantas de progênie F1 selecionadas, preferivelmente usando marcadores moleculares como aqui definido,

5 (c) retrocruzar as plantas de progênie selecionadas com referida planta parental de melão endogâmica para produzir plantas de progênie retrocruzadas.

(d) selecionar para plantas de progênie retrocruzadas que tem o traço desejado e características morfológicas e fisiológicas de referida planta de melão parental endogâmica, em que referida seleção compreende o isolamento do DNA genômico e o teste do referido DNA pela presença de
10 pelo menos um marcador molecular para QTL -1, preferivelmente como descrito aqui,

(e) repetir as etapas (c) e (d) duas ou mais vezes em sucessão para produzir terceira ou mais plantas de progênie retrocruzadas selecionadas,

(f) opcionalmente autofertilizar a progênie retrocruzada selecionada a fim de identificar as plantas homozigóticas,
15

(g) cruzar pelo menos uma dentre a referida progênie retrocruzada ou plantas autofertilizadas com outra planta de melão parental endogâmica para gerar uma variedade de melão híbrido com o traço desejado e todas as características morfológicas e fisiológicas de variedade de melão
20 híbrido quando cultivado nas mesmas condições ambientais.

Como indicado, a última geração retrocruzada pode ser autofertilizada a fim de prover uma progênie de reprodução pura homozigótica (endogâmica) para resistência a closterovírus. Assim, o resultado de seleção recorrente, retrocruzamento e autofertilização é a
25 produção de linhagens que são geneticamente homogêneas para os genes associados com a resistência a closterovírus, assim como outros genes associados com traços de interesse comercial.

Plantas e sementes de melão resistentes a closterovírus

O objetivo da reprodução de plantas é combinar em uma única

variedade ou híbridos vários traços desejáveis. Para culturas comerciais, estes traços podem incluir resistência a doenças e insetos, tolerância a calor e seca, redução do tempo até a maturidade da cultura, maior rendimento, e melhor qualidade agrônômica. A uniformidade das características da planta como germinação e estabelecimento do grupo de plantas, taxa de crescimento, maturidade, e altura da planta podem ser de grande importância.

As culturas comerciais são reproduzidas através de técnicas que levam vantagem do método de polinização das plantas. Uma planta é auto-polinizada se pólen de uma flor for transferido para a mesma ou outra flor da mesma planta. Uma planta é polinizada em "sib" quando indivíduos dentro da mesma família ou linhagem são usados para a polinização. Uma planta é polinizada cruzada se o pólen for de uma flor em uma planta diferente de uma família ou linhagem diferente.

As plantas que foram auto-polinizadas e selecionadas para tipo para muitas gerações se tornam homozigóticas em quase todos os *loci* do gene e produzem uma população uniforme de progênie com reprodução verdadeira. Um cruzamento entre duas linhagens homozigóticas diferentes produz uma população uniforme de plantas híbridas que podem ser heterozigóticas para muitos *loci* de genes. Um cruzamento de duas plantas, cada heterozigótica em um número de *loci* de genes, irá produzir uma população de plantas heterogêneas que diferem geneticamente e não serão uniformes.

O desenvolvimento de uma variedade de melão híbrido em um programa de reprodução de planta de melão envolve três etapas: (1) a seleção de plantas de vários conjuntos de germplasma para cruzamentos de reprodução iniciais, (2) a autofertilização das plantas selecionadas dos cruzamentos de reprodução por várias gerações para produzir uma série de linhagens endogâmicas, que são individualmente reproduzidas verdadeiras, e são altamente uniformes, e (3) cruzamento de uma linhagem endogâmica selecionada com uma linhagem endogâmica não relacionada para produzir a

progênie híbrida (F1). Após uma quantidade suficiente de endogâmias, gerações filiais sucessivas irão apenas servir para aumentar a produção de sementes da linhagem endogâmica desenvolvida. Preferivelmente uma
5 95% ou mais de seus *loci*.

Uma conseqüência importante da homozigosidade e homogeneidade das linhagens endogâmicas é que o híbrido criado por cruzamento de um par definido de cruzamentos endogâmicos será sempre igual. Uma vez que os cruzamentos endogâmicos que criam um híbrido
10 superior foram identificados, um suprimento contínuo da semente híbrida pode ser produzido usando estes parentais endogâmicos e as plantas de melão híbrido podem ser então geradas a partir deste suprimento de semente híbrida.

Uma planta de melão resistente a closterovírus, ou parte da mesma, obténível pelo método da invenção é um aspecto da presente
15 invenção.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a uma planta de melão resistente a closterovírus, ou parte da mesma, compreendendo os QTLs em qualquer configuração como descrito no detalhe acima, em que pelo menos um de referidos QTLs não está em seu antecedente genético natural.
20 As plantas de melão resistentes a closterovírus da presente invenção podem ser de qualquer tipo genético como endogâmico, híbrido, haplóide, dihaplóide, ou transgênico. Além disso, as plantas da presente invenção podem ser heterozigóticas ou heterozigóticas para os traços de resistência, preferivelmente homozigóticas. Apesar dos QTLs da presente invenção, assim
25 como partes conferindo resistência dos mesmos poderem ser transferidos a qualquer planta a fim de prover uma planta resistente a closterovírus, os métodos e plantas da invenção são preferivelmente relacionados com plantas da espécie *Cucumis melo*.

As linhagens de melão endogâmicas resistentes a closterovírus

descritas aqui podem ser usadas em cruzamentos adicionais para criar plantas híbridas resistentes a closterovírus. Por exemplo, uma primeira planta de melão endogâmica resistente a closterovírus da invenção pode ser cruzada com uma segunda planta de melão endogâmica possuindo traços comercialmente desejáveis como, mas não limitados a resistência a doença, resistência a insetos, características de frutas desejáveis, etc. Esta segunda linhagem de melão endogâmica pode ou não ser resistente a closterovírus.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método de produzir sementes que podem ser cultivadas em plantas de melão resistentes a closterovírus. Em uma forma de realização, o método compreende as etapas de prover uma planta de melão resistente a closterovírus da invenção, cruzando referida planta resistente a closterovírus com outra planta de melão, e coletando as sementes resultantes do referido cruzamento, que quando plantadas, produzem plantas de melão resistentes a closterovírus.

Em outra forma de realização, o método compreende as etapas de prover uma planta de melão resistente a closterovírus da invenção, cruzando referida planta resistente a closterovírus com uma planta de melão, coletando as sementes resultantes do referido cruzamento, regenerando referidas sementes em plantas, selecionando as plantas resistentes a closterovírus por qualquer um dos métodos aqui descritos., auto-polinizando as plantas selecionadas para um número suficiente de gerações de modo a obter plantas que são fixadas para um alelo que confere resistência a closterovírus em plantas, retrocruzando as plantas assim produzidas com plantas de melão tendo traços fenotípicos desejáveis por um número suficiente de gerações para obter plantas de melão que são resistentes a closterovírus e tem traços fenotípicos desejáveis e coletar as sementes produzidas das plantas resultantes do último retrocruzamento, que quando plantadas produzem plantas de melão que são resistentes a closterovírus.

REFERÊNCIAS

- Altschul Fr, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *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. *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.
- 5 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* Gl.1601 co-localize with two qualitative powdery mildew resistance genes. *Mol. plant microbe interactions* 16: 169-176.
- 10 Christou P, Murphy JE, and Swain WF (1987) Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus. *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 *Escherichia coli* plasmid. *EMBO J.* 4:2731-2737.
- 15 D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J (1992) *Plant. CeU* 4: 1495-1505.
- Draper J, Davey MR, Freeman JP, Cocking EC and Cox BJ (1982) Ti plasmid homologous sequences present in tissues from *Agrobacterium* plasmid-transformed *Petunia* protoplasts. *Plant and Cell Physiol.* 23, 451-458.
- 20 Eckstein F (ed) (1991) *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach.* Oxford Univ. Press, NY 1991.
- Gruber MY, Crosby WL (1993) Vectors for plant transformation. In BR Glick, JE Thompson, eds, *Methods in Plant Molecular Biology and*
- 25 *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. *Mol. Gen. Genet.* 199:161-168.
- Horsch RB, Fraley RT, Rogers SG, Sanders PR, Lloyd A (1985) A simple

and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.

Kado CI (1991): Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Crit. Rev. Plant ScL* 10, 1-32.

5 Klein TM, Arentzen R, Lewis PA, and Fitzpatrick- McElligott S (1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *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
10 culture cells. *Plant MoI Biol.* 24(1):51-61.

López-Sese AI, Gómez-Guillamón ML (2000) Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) in *Cucumis melo* L. *Hortscience* 35:110-113.

Lui B H (1997) *Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis*. CRC Press, Boca Raton, FL.

15 Miki BL, Fobert PF, Charest PJ, Iyer VN. 1993. Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants. In: Glick BR and Thompson JE (Eds.) *Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology*, CRC Press, pp. 67-88.

Moloney MM, Walker JM, Sharma KK (1989) High efficiency transformation oi *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Rep*
20 8: 238- 242.

Nesbitt TC, Tanksley SD (2001) *fw2.2* directly affects the size of developing tomato fruit, with secondary effects on fruit number and photosynthate distribution. *Plant Physiol.* 127: 575-583.

Phillips RL, Somers DA, Hibberd KA. 1988. Cell/tissue culture and in vitro
25 manipulation. In: G.F. Sprague & J. W. Dudley, eds. *Corn and corn improvement*, 3rd ed., p. 345-387. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy.

Sambrook J, e Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New 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. *J. Particulate Sci Technol.* 5:27-37.

Sanford JC (1988) The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 6:299-302.

5 Sanford JC (1990) Biolistic plant transformation. *Physiologica Plantarum*, 79, 206-209.

Sanford JC, Smith FD, e Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology* 217:483-509.

10 Tijssen P (1993) Hybridization With Nucleic Acid Probes. Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier.

Van Berloo R, Aalbers H, Werkman A, Niks RE (2001) Resistance QTL confirmed through development of QTL-NILs for barley leaf rust resistance. *Mol. Breeding*: 187-195.

15 Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Homes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.

Zhang L, Cheng L, Xu N, Zhao M, Li C, Yuan J, and Jia S (1991)Efficient transformation of tobacco by ultrasonication. *Biotechnology* 9:996-997.

REIVINDICAÇÕES

1. Planta da espécie *Cucumis melo*, caracterizada pelo fato de referida planta compreender um elemento genético derivado de uma planta da espécie *Cucumis melo* var. *agrestis*, cujo elemento genético compreende um QTL conferindo resistência a closterovírus, ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo ligado a pelo menos um marcador localizado no cromossomo equivalente ao grupo de ligação (LG) 6 de melão acesso PI313970, em que referida planta não é melão acesso PI313970.

2. Planta de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que referida planta da espécie *Cucumis melo* é um cultivar de melão e/ou uma planta do grupo consistindo de variedades botânicas *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, *Cucumis melo*, var. *reticulatis* ou *Cucumis melo* var. *inodorus*.

3. Planta de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que referido elemento genético é derivado de melão acesso PI313970.

4. Planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, caracterizada pelo fato de que referido QTL conferindo resistência a closterovírus é um QTL conferindo resistência a CYSDV.

5. Planta de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que referido elemento genético está presente em uma forma homozigótica e em que referida planta é resistente a closterovírus.

6. Planta de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que referido QTL se estende em uma região no cromossomo de cerca de 1,9 a cerca de 17,2 cM.

7. Planta de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que referido elemento genético é uma introgressão.

8. Planta de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que referido QTL é ligado a pelo menos um marcador selecionado dentre o grupo consistindo de E11/M54-156, E14/M54-152, E14/M51-210, E14/M51-083, E11/M49-239, E11/M54-169, 5 E14/M50-262, E11/M57-278, E11/M54-163 e/ou E11/M49-072, referido QTL preferivelmente sendo ligado ao marcador E11/M49-239.

9. Planta de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que referido closterovírus é CYSDV.

10 10. Planta de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que referida planta é um cultivar de melão resistente a closterovírus.

11. Planta de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que referida planta é uma planta endogâmica ou planta híbrida.

15 12. Parte de uma planta, caracterizada pelo fato de ser como definida em qualquer uma das reivindicações precedentes.

13. Parte de planta de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que referida planta é uma planta endogâmica ou planta híbrida e referida parte de planta é uma semente ou fruto.

20 14. Local de traço quantitativo (QTL) conferindo resistência a closterovírus, caracterizado pelo fato de ser ligado a pelo menos um marcador localizado no cromossomo equivalente ao grupo de ligação (LG) 6 de melão acesso PI313970 ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo.

25 15. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de compreender um QTL como definido na reivindicação 14, em que referido QTL se estende em uma região no cromossomo de cerca de 1,9 a cerca de 17,2 cM.

16. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 15,

caracterizado pelo fato de que referido QTL é ligado a pelo menos um marcador selecionado dentre o grupo consistindo de 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 e/ou E11/M49-072, referido QTL preferivelmente sendo ligado ao marcador E11/M49-239.

17. Sequência de ácido nucleico isolado como definida na reivindicação 15 ou 16, caracterizada pelo fato de que referido closterovírus é CYSDV.

18. Método de produzir uma planta de melão resistente a closterovírus, caracterizado pelo fato de compreender a etapa de transferir um ácido nucleico compreendendo o QTL, como definido em qualquer uma das reivindicações 14-17, ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo, a partir de uma planta de melão doadora resistente a closterovírus em uma planta de melão recipiente suscetível a closterovírus, em que referida transferência de referido ácido nucleico é realizada por transformação, por fusão de protoplasto, por uma técnica haplóide duplicada, ou por resgate de embrião.

19. Método de produzir uma planta de melão resistente a closterovírus, referido método caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

(a) introgridir um ácido nucleico compreendendo o QTL, como definido em qualquer uma das reivindicações 14-16, ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo, de uma planta resistente a closterovírus da espécie *Cucumis melo* var. *agrestis*, preferivelmente do melão acesso PI313970, ou um derivado resistente a closterovírus do mesmo, a uma planta de melão recipiente suscetível a closterovírus, e

b) determinar a presença de referido QTL conferindo resistência a closterovírus no genoma de pelo menos uma planta de progênie por detecção da presença no DNA da referida pelo menos uma planta de

progênie de um marcador molecular ligado ao referido QTL.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que referida etapa a) compreende as etapas de:

5 - cruzar uma planta resistente a closterovírus da espécie *Cucumis melo* var. *agrestis*, preferivelmente de melão acesso PI313970, ou um derivado resistente a closterovírus da mesma, com uma planta de melão suscetível a closterovírus,

- coletar semente do referido cruzamento;

10 - cultivar referida semente para produzir plantas de progênie de F1;

- realizar endogamia ou retrocruzamento das referidas plantas de progênie F1 com o doador ou parental recipiente para produzir sementes F2; e

15 cultivar as referidas sementes F2 para produzir plantas de progênie F2.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a detecção de referido marcador molecular ligado ao referido QTL é realizada em uma planta de progênie F2.

20 22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 19-21, caracterizado pelo fato de que referida planta de melão recipiente suscetível a closterovírus é uma planta do grupo consistindo de variedades botânicas *Cucumis melo* var. *cantalupensis*, *Cucumis melo*, var. *reticulatis* ou *Cucumis melo* var. *inodorus*, mais preferivelmente uma linhagem da mesma que possui características comercialmente desejáveis.

25 23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 18-22, caracterizado pelo fato de ainda compreender selecionar dentre as plantas descendentes uma planta que compreende em seu genoma referido pelo menos um QTL, ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a referida seleção compreende a seleção auxiliada por marcador com um marcador ligado ao referido QTL.

5 25. Planta de melão resistente a closterovírus, ou uma parte da mesma, caracterizada pelo fato de ser obténível por um método como definido em qualquer uma das reivindicações 18-24.

10 26. Planta de melão híbrida, ou parte da mesma, caracterizada pelo fato de ser obténível por cruzamento de uma planta de melão como definida em qualquer uma das reivindicações 1-11 ou 25 com uma planta de melão que demonstra características comercialmente desejáveis.

27. Semente de melão, caracterizada pelo fato de ser produzida por cultivo da planta de melão como definida em qualquer uma das reivindicações 1-11, 25 ou 26.

15 28. Uso de um ácido nucleico isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 15-17, caracterizado pelo fato de ser para a produção de plantas de melão resistentes a closterovírus.

20 29. Uso de um marcador selecionado dentre o grupo consistindo de 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 e E11/M49-072, caracterizado pelo fato de ser para a detecção de uma planta de melão resistente a closterovírus.

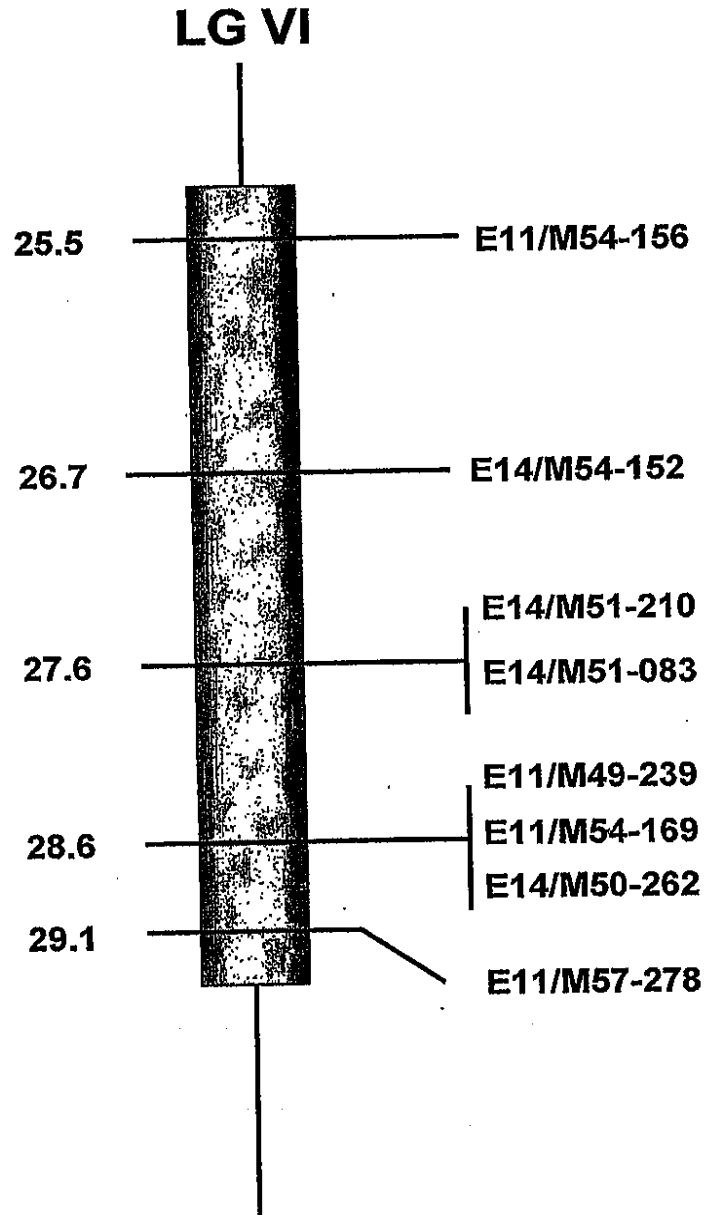


Figura 1

RESUMO

“PLANTA, PARTE DE UMA PLANTA, LOCAL DE TRAÇO QUANTITATIVO CONFERINDO RESISTÊNCIA A CLOSTEROVÍRUS, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, SEQÜÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, MÉTODO DE PRODUZIR UMA PLANTA DE MELÃO RESISTENTE A CLOSTEROVÍRUS, SEMENTE DE MELÃO, E, USOS DE UM ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, E DE UM MARCADOR”

A presente invenção refere-se a planta da espécie *Cucumis melo*, referida planta compreendendo um elemento genético derivado de uma planta da espécie *Cucumis melo* var. *agrestis*, cujo elemento genético compreende um QTL conferindo resistência a closterovírus ou uma parte conferindo resistência a closterovírus do mesmo ligado a pelo menos um marcador localizado no cromossomo equivalente a um grupo de ligação (LG) 6 de melão acesso PI 313970, em que referida planta não é melão acesso PI313970.