

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 766**

51 Int. Cl.:

A01H 5/08 (2008.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

A01H 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2013 E 19175414 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2024 EP 3560331**

54 Título: **Plantas de melón con resistencia al virus asociado al amarilleamiento del melón (MYaV)**

30 Prioridad:

12.12.2012 EP 12196771
04.04.2013 EP 13162350

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2024

73 Titular/es:

NUNHEMS B.V. (100.0%)
Napoleonsweg 152
6083 AB Nunhem, NL

72 Inventor/es:

OGUNDIWIN, EBENEZER A;
ANTONIO VIEIRA BENTO, DYEME y
VISSER, PETER

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 766 T3

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 melón con resistencia al virus asociado al amarilleamiento del melón (MYaV)

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la mejora genética vegetal, en particular a la mejora genética de melones.
 10 La invención proporciona el locus genético que confiere resistencia al virus asociado al amarilleamiento del melón (MYaV, forma siglada del inglés: *Melon Yellowing associated Virus*) como se encuentra en accesiones de melón silvestre, y plantas de melón cultivadas que comprenden dicho locus genético (o una parte que confiere resistencia del mismo), que confiere a dichas plantas resistencia a MYaV. Además, se proporcionan semillas a partir de las cuales tales plantas se pueden cultivar, partes de plantas, células, tejidos u órganos de tales plantas, y procedimientos de mejora genética para transferir el locus de resistencia a MYaV, o parte que confiere resistencia del mismo, a otras plantas o células vegetales de melón cultivado, especialmente a plantas de melón susceptibles al MYaV. También se proporcionan marcadores moleculares con los que dicho locus genético puede identificarse en plantas y células vegetales, y/o transferirse a otras plantas o células vegetales de melón. Como la resistencia a MYaV presente en el locus genético es dominante, las plantas y/o células vegetales resistentes al MYaV pueden comprender el locus genético en forma homocigótica o heterocigótica.

Antecedentes de la invención

20 Desde 1999, se informó que una nueva enfermedad que provoca síntomas descritos como "amarilleamiento de plantas de melón" provocaba daños en el noreste de Brasil, que es la región donde tiene lugar más del 90 % de la producción brasileña de melón. Los síntomas son el moteado y el amarilleamiento de las hojas y se observan principalmente en las hojas más antiguas (Nagata y col. 2003, *Plant Pathology* 52, 797). El virus que provocó esta enfermedad se denominó tentativamente virus asociado al amarilleamiento del melón (MYaV) (Nagata y col., 2003, citado anteriormente y Nagata y col., 2005, *Arch. Virology* Vol. 150(2):379-87). En 2007, la detección serológica (utilizando un anticuerpo policlonal desarrollado para la detección de MYaV, (véase Avila y col. 2008 *Trop. Plant Pathol.* v.33 n.3 *Brasilia* mayo/jun. de 2008) reveló que un gran porcentaje de plantas de melón sintomáticas estaban infectadas con MYaV (Lima y col. *Hortic. Bras.* vol. 27 n.º 4 *Brasilia* oct./dic. de 2009). La región más afectada fue el estado de Rio Grande do Norte, en Mossoro, con el 96,3 % de los melones infectados. De forma interesante, las concentraciones de virus fueron mayores en extractos preparados a partir de tallos de plantas sintomáticas que a partir de hojas.

30 Los síntomas típicos de la enfermedad aparecen como moteado y amarilleamiento en las hojas, principalmente de las hojas más antiguas, de forma similar a un trastorno nutricional (ver Nagata y col., 2003, citado anteriormente y la Fig. 1 de Nagata y col. 2010, *Journal of General Plant Pathology* Volumen 76, N.º 4, página 268-272). En el tejido foliar infectado que muestra síntomas amarillentos, se pueden observar por microscopía electrónica partículas de virus filamentosas de 600-700 nm de longitud.

35 El virus que se encuentra en las plantas con los síntomas de amarilleamiento de la enfermedad se transmite de unas plantas de melón a otras mediante la mosca blanca (*Bemisia tabaci* biotipo B). Además, se puede utilizar el injerto para transmitir el virus a otras plantas de melón o a *Cucumis anguria* (pepino silvestre). Mediante microscopía electrónica, se observaron en hojas infectadas partículas filamentosas largas de tipo *Carlavirus* y cuerpos de inclusión, lo que sugirió la presencia de un virus del género *Carlavirus* (Nagata y col. 2003, *Plant Pathol* 52:797). Nagata y col. 2005 (citado anteriormente) secuenciaron dos genes, la proteína de la cubierta (ORF-A) y un marco de lectura abierto más (ORF-B), véase el número de referencia de GenBank AY373028. Como el *virus del moteado leve del caupí* (CPMMV, forma siglada del inglés *Cowpea mild mottle virus*) era la única especie de *carlavirus* conocida por ser transmitida por la mosca blanca, se esperaba que las propiedades genéticas y serológicas del MYaV fueran similares a las de CPMMV. Sin embargo, el MYaV no reaccionó de forma cruzada en un ensayo de inmunounión puntual con anticuerpos del CPMMV (Nagata y col. 2003, citado anteriormente), y los datos de secuencia genómica mostraron que la proteína de la cubierta (PC) del CPMMV no estaba estrechamente relacionada con la del MYaV (Nagata y col. 2005, citado anteriormente).

40 Inicialmente, no estaba claro si incluir al MYaV dentro del género *Carlavirus* o si debía ser un nuevo género en la familia *Flexiviridae* (Nagata y col. 2005, citado anteriormente). Sin embargo, en un estudio reciente (Nagata y col. 2010, citado anteriormente), se estima que se clonó y secuenció el 40 % (aproximadamente 3,1 kb) del genoma del MYaV y, basándose en estos datos, los autores sugieren que el virus es una especie nueva dentro del género *Carlavirus* y sugieren cambiar el nombre de este virus a virus del amarilleamiento del melón (MYV). La secuencia de 3,1 kb contenía 5 marcos de lectura abiertos (ORF), que codifican tres proteínas de bloque génico triple (*Triple Gene Block*) (TGB1, TGB2 y TGB3), la proteína de la cubierta (PC) y la supuesta proteína de unión a ácido nucleico (NABP, forma siglada de *nucleic acid binding protein*), véase el número de referencia de GenBank AB510477. La secuencia de la proteína de la cubierta (PC) en este estudio tenía una identidad de secuencia del 93 % con la secuencia de ORF-A (AY373028).

55 Como no hay disponibles plantas con resistencia contra el virus, una estrategia desarrollada para limitar la infección por MYaV es cubrir todo el campo con una capa de tela no tejida hilada desde la germinación hasta la floración, para prevenir la transmisión del virus por la mosca blanca. Sin embargo, las plantas se volvieron sensibles a los minadores

de hojas (*Liriomisa* spp.), lo que se convirtió en una producción de fruta muy dañada de forma generalizada (Nagata y col. 2010, citado anteriormente).

Es un objeto de la invención proporcionar fuentes de resistencia a MYaV y una región genética que comprende el locus de resistencia o una parte del mismo, que confiere resistencia frente al MYaV. Es un objeto adicional de la invención proporcionar plantas de melón cultivadas (*Cucumis melo* L.) y células, tejidos, frutas y otras partes de tales plantas que comprenden en su genoma un locus que confiere resistencia a MYaV (o una parte que confiere resistencia del mismo), ya sea en forma homocigótica o heterocigótica, mediante lo cual las plantas de melón son resistentes frente al MYaV. Además, son una realización de la invención semillas a partir de las cuales se pueden cultivar plantas de melón resistentes al MYaV.

En un aspecto adicional se proporcionan marcadores moleculares, que pueden utilizarse para detectar la presencia y/o transferir el locus que confiere resistencia a MYaV, o una parte que confiere resistencia del mismo, en/dentro de plantas o células vegetales de *Cucumis melo* L. Uno o más de los marcadores pueden, por tanto, utilizarse, por ejemplo, para transferir el locus de resistencia, o una parte que confiere resistencia del mismo, a plantas de melón que sean susceptibles al MYaV. En una realización, el locus de resistencia, o parte que confiere resistencia del mismo, es el locus en el cromosoma 6 que se encuentra en las semillas depositadas con el número de referencia NCIMB 41966 o NCIMB 41969. En una realización adicional, el locus de resistencia o parte que confiere resistencia del mismo es el locus en el cromosoma 6, o una parte que confiere resistencia del mismo, como se encuentra en otras plantas de melón silvestre.

Se pueden utilizar también uno o más de los marcadores ligados, o asociados con, el locus de resistencia a MYaV, o parte que confiere resistencia del mismo, para identificar nuevas fuentes de resistencia a MYaV, tal como otras accesiones silvestres de *Cucumis melo* que comprenden un locus de resistencia a MYaV en el cromosoma 6, y para transferir (introgresar) el locus de resistencia, o una parte que confiere resistencia a MYaV del mismo, de tales accesiones a plantas de melón cultivadas. La resistencia a MYaV que confiere el locus del rasgo cuantitativo (QTL, forma siglada de *quantitative trait locus*) en el cromosoma 6 (equivalente al grupo de ligamiento VI de la ICuGI (forma siglada de *International Cucurbit Genomics Initiative*: Iniciativa internacional de genómica de cucurbitáceas), o GL VI) fue nombrada *MYaV6.1*.

El documento EP1962578B1 describe un QTL de resistencia al CYSDV (forma siglada de *cucurbit yellow stunting disorder virus*: virus del amarilleo y enanismo de las cucurbitáceas) de PI313970 en un grupo de ligamiento, designado arbitrariamente como GL6, y reivindica plantas de melón que comprenden una introgresión de PI313970, cuya introgresión comprende un QTL de resistencia a CYSDV ligado a al menos un marcador ubicado en el cromosoma equivalente al grupo de ligamiento (GL) 6 de la accesión de melón PI313970. Debe tenerse en cuenta que en el documento EP1962578B1, el GL6 nombrado de manera arbitraria es el GL VI de la ICuGI de melón, pero corresponde al Grupo de Ligamiento V (GL V) de la ICuGI. En un aspecto, la planta de la invención en el presente documento, es decir, una planta de *Cucumis melo* cultivada que comprende una resistencia frente al virus asociado al amarilleamiento del melón (MYaV), en la que dicha resistencia es conferida por un fragmento de introgresión en el cromosoma 6 en forma homocigótica o heterocigótica, y en la que dicho fragmento de introgresión es de una planta silvestre de la especie *Cucumis melo*, no comprende el QTL de resistencia al CYSDV como se describe en el documento EP1962578B1. En otro aspecto, la planta de la invención, es decir, una planta de *Cucumis melo* cultivada que comprende una resistencia frente al virus asociado al amarilleamiento del melón (MYaV), en la que dicha resistencia es conferida por un fragmento de introgresión en el cromosoma 6 en forma homocigótica o heterocigótica, y en la que dicho fragmento de introgresión es de una planta silvestre de la especie *Cucumis melo*, no comprende los marcadores E11/M49-239, como se define en el párrafo [0037] del documento EP 1962578 B1. En otro aspecto más, la planta de la invención no comprende 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 como se define en el párrafo [0040] del documento EP1962578 B1. En aún otra realización, la planta de la invención no comprende los marcadores E11/M54-156, E14/M54-152, E14/M51-210, E14/M51-083, E11/M49-239, E11/M64-169, E14/M60-262, E11/M67-278, E11/M64-163 y/o E11/M49-072 como se define en el párrafo [0013] del documento EP 1962578 B1. Los pasajes citados del documento EP1962578B1 se adjuntan en el presente documento como referencia. En otro aspecto más, las plantas de la invención, es decir, una planta de *Cucumis melo* cultivada que comprende una resistencia frente al virus asociado al amarilleamiento del melón (MYaV), en la que dicha resistencia es conferida por un fragmento de introgresión en el cromosoma 6 en forma homocigótica o heterocigótica, y en la que dicho fragmento de introgresión es de una planta silvestre de la especie *Cucumis melo*, no tienen un fenotipo de CYSDV (es decir, no son resistentes al CYSCV).

Definiciones generales

El artículo indefinido "un" o "uno, una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto precise claramente que haya uno y solo uno de los elementos. Por tanto, el artículo indefinido "un" o "una" habitualmente significa "al menos uno o una".

Como se usa en el presente documento, el término "planta" incluye la planta completa o cualquiera de sus partes o derivados de la misma, tales como órganos vegetales (por ejemplo, órganos de almacenamiento cosechados o no cosechados, tubérculos, frutos, hojas, semillas, etc.), células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de células o tejidos vegetales a partir de los que pueden regenerarse plantas, callos de plantas, agrupaciones de células vegetales,

y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas, tales como los embriones, polen, óvulos, ovarios, frutos (por ejemplo, tejidos u órganos cosechados, tales como melones cosechados o partes de los mismos), flores, hojas, semillas, tubérculos, bulbos, plantas reproducidas de forma clonal, raíces, rizomas, tallos, puntas de raíces y similares. Además, se incluye cualquier fase del desarrollo, tal como las plántulas, inmadura y madura, etc. Cuando se hace referencia a "semillas de una planta", estas se refieren a semillas de las cuales se puede cultivar la planta o a semillas producidas en la planta, después de la autofecundación o la fecundación cruzada.

"Variedad vegetal" es un grupo de plantas dentro del mismo taxón botánico del grado más bajo conocido, que (independientemente de si se cumplen o no las condiciones para el reconocimiento de los derechos del obtentor de plantas) puede definirse en función de la expresión de características que son el resultado de un determinado genotipo o una combinación de genotipos, puede distinguirse de cualquier otro grupo de plantas por la expresión de al menos una de esas características, y puede considerarse como una entidad, debido a que se pueden multiplicar sin ningún cambio. Por lo tanto, la expresión "variedad vegetal" no puede utilizarse para indicar un grupo de plantas, incluso si son del mismo tipo, si todas se caracterizan por la presencia de uno o dos locus o genes (o características fenotípicas debidas a estos locus o genes específicos), pero que de lo contrario pueden diferir enormemente entre sí en lo que respecta a los otros locus o genes.

"F1, F2, F3, etc." se refiere a las generaciones relacionadas consecutivas después de un cruce entre dos plantas parentales o líneas parentales. Las plantas cultivadas a partir de las semillas producidas al cruzar dos plantas o líneas se llama generación F1. La autofecundación de las plantas F1 da como resultado la generación F2, etc.

La planta "híbrida F1" (o semilla híbrida F1) es la generación obtenida al cruzar dos líneas parentales endogámicas. Por tanto, las semillas híbridas F1 son semillas a partir de las cuales crecen las plantas híbridas F1. Los híbridos F1 son más vigorosos y de mayor rendimiento, debido a la heterosis.

El término "alelo (o alelos)" significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen en un locus particular, alelos que se relacionan todos con un rasgo o característica en un locus específico. En una célula diploide de un organismo, los alelos de un gen dado se emplazan en una ubicación específica, o locus (plural, locus) en un cromosoma. En cada cromosoma del par de cromosomas homólogos está presente un alelo. Una especie de planta diploide puede comprender una gran cantidad de alelos distintos en un locus particular. Estos pueden ser alelos idénticos del gen (homocigótico) o dos alelos distintos (heterocigótico). Por tanto, por ejemplo, en el presente documento se puede hacer referencia a un alelo de MYaV del locus de resistencia a MYaV *MYaV6.1*.

El término "gen" significa una secuencia de ADN (genómica) que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN mensajero (ARNm) en una célula y una región reguladora unida operativamente (por ejemplo, un promotor). Los distintos alelos de un gen son, por tanto, distintas formas alternativas del gen, que pueden estar en forma de, por ejemplo, diferencias en uno o más nucleótidos de la secuencia de ADN genómico (por ejemplo, en la secuencia del promotor, las secuencias exónicas, la secuencias intrónicas, etc.), de la secuencia del ARNm y/o de aminoácidos de la proteína codificada.

El término "locus" (plural, locus) significa un lugar o lugares específicos o un sitio en un cromosoma donde, por ejemplo, se encuentra un gen o marcador genético. El locus de resistencia a MYaV (o locus que confiere resistencia MYaV) es, por tanto, la ubicación en el genoma del melón, donde se encuentra el gen de resistencia a MYaV. En el melón cultivado, el locus de resistencia a MYaV se encuentra en el cromosoma 6 (utilizando la nomenclatura de la ICuGI para cromosomas o grupos de ligamiento, es decir, el GLVI) y preferentemente introgre en el genoma del melón cultivado (es decir, en el cromosoma 6 o GLVI) a partir de accesiones de melón silvestre, tales como (pero sin limitación) las dos accesiones de melón silvestre depositadas con los números de referencia NCIMB 41966 y NCIMB41969, o a partir de otros melones silvestres que se pueden cruzar con *C. melo* y de cuyos cruces se puede producir una descendencia fértil.

Un "locus de rasgo cuantitativo" o "QTL" es un locus cromosómico que codifica uno o más alelos que afectan la expresividad de un fenotipo distribuido de forma continua (cuantitativo). La resistencia a MYaV que confiere el locus de rasgo cuantitativo se denomina en el presente documento *MYaV6.1*.

"ICuGI" (forma siglada del inglés *International Cucurbit Genomics Initiative*) se refiere a Iniciativa Internacional de los Genomas de las cucurbitáceas, que publica mapas genéticos de, por ejemplo, *Cucumis melo* (http://www.icugi.org/cgi-bin/cmap/map_set_info?specie_acc=CM). La versión actual del mapa genómico de *C. melo* es del 4 de marzo de 2012 y el mapa del cromosoma 6 se denomina ICuGI_VI (o GL VI, o Grupo de Ligamiento VI), y contiene 124 marcadores (11 AFLP, 1 ISSR, 19 RAPD, 17 RFLP, 31 SNP, 45 marcadores SSR) en un grupo de ligamiento que abarca de 0,00 a 98,00 cM. En el presente documento, cromosoma 6 de melón y GL VI se usan indistintamente.

La "distancia genética" entre locus (por ejemplo, entre marcadores moleculares y/o entre marcadores fenotípicos) en el mismo cromosoma se mide por la frecuencia de entrecruzamiento o frecuencia de recombinación (FR) y se indica en centimorgans (cM). Un cM corresponde a una frecuencia de recombinación del 1%. Si no se pueden encontrar recombinantes, la FR es cero y los locus están extremadamente juntos físicamente o son idénticos. Cuanto más separados están dos locus, mayor es la FR.

La "distancia física" entre locus (por ejemplo, entre marcadores moleculares y/o entre marcadores fenotípicos) en el

mismo cromosoma es la distancia física real expresada en pares de bases (pb), kilo pares de bases (kb) o mega pares de bases (Mb). *C. melo* tiene un tamaño total del genoma haploide de aproximadamente 450 Mb, dividido en 12 pares de cromosomas, véase García-Mas y col., PNAS 2 de julio de 2012, p1-6 y Gonzales y col. 2010, BMC Genomics 11:339, p1-13.

5 "Fragmento de introgresión" o "segmento de introgresión" o "región de introgresión" se refiere a un fragmento de cromosoma (o parte o región del cromosoma) que se ha introducido en otra planta de la misma especie o de una especie relacionada mediante técnicas de cruzamiento o técnicas tradicionales de mejora genética, tales como el retrocruzamiento, es decir, el fragmento introgresado es el resultado de procedimientos de mejora genética a los que se hace referencia mediante el verbo "introgresar" (tal como retrocruzamiento). En el melón, las accesiones de melón silvestre o parientes silvestres del melón se utilizan a menudo para introgresar fragmentos del genoma silvestre en el genoma del melón cultivado, *Cucumis melo*. Dicha planta de melón cultivada tiene, por tanto, un "genoma de *C. melo*" cultivado, pero comprende en el genoma un fragmento de un melón silvestre o de un pariente silvestre del melón, por ejemplo, un fragmento de introgresión de un genoma de *Cucumis* silvestre relacionado, tal como *Cucumis melo* ssp. *agrestis*, *C. melo* ssp. *melo*, *C. melo* ssp. *acidulous*, *C. callosus*, *C. trigonus*, *C. picrocarpus*, u otro melón silvestre o pariente silvestre del melón. Se entiende que la expresión "fragmento de introgresión" nunca incluye un cromosoma completo, sino solo una parte de un cromosoma. El fragmento de introgresión puede ser grande, por ejemplo, incluso la mitad de un cromosoma, pero preferentemente es más pequeño, tal como de aproximadamente 15 Mb o menos, tal como de aproximadamente 10 Mb o menos, de aproximadamente 9 Mb o menos, de aproximadamente 8 Mb o menos, de aproximadamente 7 Mb o menos, de aproximadamente 6 Mb o menos, de aproximadamente 5 Mb o menos, de aproximadamente 4 Mb o menos, de aproximadamente 3 Mb o menos, de aproximadamente 2 Mb o menos, de aproximadamente 1 Mb (equivalente a 1.000.000 pares de bases) o menos, o de aproximadamente 0,5 Mb (equivalente a 500.000 pares de bases) o menos, tal como de aproximadamente 200.000 pb (equivalente a 200 kilo pares de bases) o menos, de aproximadamente 100.000 pb (100 kb) o menos, de aproximadamente 50.000 pb (50 kb) o menos, aproximadamente 25.000 pb (25 kb) o menos.

25 El "*alelo de MYaV*" se refiere a un alelo que confiere resistencia a MYaV que se encuentra en el locus que confiere resistencia a MYaV *MYaV6.1*, o en la parte del locus que confiere resistencia, introgresado en el melón cultivado (en el cromosoma 6 de *C. melo* cultivado), procedente de un melón silvestre o pariente silvestre del melón, por ejemplo, de plantas de las cuales se depositó una muestra representativa de semillas con el número de referencia NCIMB 41966 o NCIMB 41969. La expresión "*alelo de MYaV*", por tanto, también abarca los alelos de MYaV que se pueden obtener de otras accesiones de *Cucumis* resistentes a MYaV, tal como alelos ortólogos de *MYaV* (véase más abajo). Cuando están presentes uno o dos alelos de MYaV en el locus que confiere resistencia a MYaV en el genoma (es decir, en forma heterocigótica u homocigótica), la planta es resistente al MYaV, es decir, tiene un fenotipo de resistencia MYaV. En la planta de melón cultivada que carece del fragmento de introgresión, el alelo de *C. melo* encontrado en el mismo locus en el cromosoma 6 se denomina en el presente documento alelo "*myav*" alelo (o alelo susceptible a MYaV). Como la resistencia es dominante, las plantas *myav/myav* muestran un fenotipo susceptible al MYaV, mientras que las plantas *MYaV/myav* y las plantas *MYaV/MYaV* son plantas que poseen el fenotipo resistente al MYaV conferido por el alelo MYaV (es decir, son resistentes al MYaV).

40 "Alelos ortólogos de *MYaV*" u "ortólogos de *MYaV*", u "ortólogos para *MYaV*" son alelos de genes de resistencia a MYaV presentes en otros parientes silvestres del melón, en los cromosomas ortólogos 6. Dichos alelos ortólogos pueden, por tanto, encontrarse en el cromosoma 6 ortólogo de parientes silvestres de *C. melo*, tales como *C. callosus*, *C. trigonus*, *C. picrocarpus* y otros, y son transferibles, por introgresión, al cromosoma 6 de *C. melo*.

Un "fenotipo de resistencia MYaV" o "resistencia a MYaV", o "plantas resistentes al MYaV", se refiere a la resistencia frente al MYaV conferida por el alelo *MYaV* (o por el alelo ortólogo de *MaYV*) cuando está presente en el genoma de *C. melo* en dos copias (en forma homocigótica). El fenotipo de resistencia MYaV y la presencia del alelo *MYaV* y/u ortólogos de *MYaV* puede analizarse utilizando el "ensayo de resistencia MYaV" y/o ensayos de marcadores de *MYaV*.

Un "ensayo de resistencia a MYaV" puede llevarse a cabo de distintas maneras, ya sea por injerto o, preferentemente, como prueba de campo, como también se describe en otra parte en el presente documento. Preferentemente, se utiliza un ensayo de campo una zona de alta incidencia natural de *Bemisia tabaci* biotipo B, que porta el MYaV, tal como el noreste de Brasil u otras zonas donde hay una alta incidencia de enfermedad por el MYaV (es decir, un área infestada por MYaV). Una planta de un genotipo particular se considera resistente al MYaV si la puntuación promedio de resistencia a la enfermedad de una pluralidad de plantas (al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, preferentemente en al menos dos o tres repeticiones) de ese genotipo es significativamente mayor en comparación con los controles susceptibles (plantas que carecen de un fragmento de introgresión que comprende un *alelo MYaV* o un ortólogo de *MYaV*, tales como las variedades de melón Galia Amaregal F1 (Nunhems) o Glory (Origene Seeds); o las variedades de melón Piel de Sapo Medellín (Nunhems) o Sancho (Syngenta)), cuando se cultiva en el mismo entorno. Por tanto, por ejemplo, las plantas de melón de una línea que comprende la introgresión del locus que confiere resistencia a MYaV, o una parte que confiere resistencia del mismo, en forma heterocigótica u homocigota, se pueden cultivar junto con plantas de melón de control adecuadas (especialmente plantas de melón susceptibles a MYaV) en un campo abierto en el noreste de Brasil y, cuando todas las plantas de los controles susceptibles muestren síntomas claros de amarilleamiento (véase la Figura 2) todas las plantas se fenotipan en una escala de resistencia a la enfermedad de 1 (hojas totalmente amarillas, es decir, las hojas en el primer 1/3 de la planta son el 100 % amarillas) a 9 (hojas totalmente verdes; las hojas en el primer 1/3 de la planta son el 100 % verdes), por lo que 2 = aproximadamente el

81 % al 99 % del área foliar en el primer 1/3 de la planta es amarilla, 3 = aproximadamente el 65 % al 80 % del área foliar en el primer 1/3 de la planta es amarilla, 4 = aproximadamente el 49 % al 64 % del área foliar en el primer 1/3 de la planta es amarilla, 5 = aproximadamente el 33 % al 48 % del área foliar en el primer 1/3 de la planta es amarilla, 6 = aproximadamente el 17 % al 32 % del área foliar en el primer 1/3 de la planta es amarilla, 7 = hasta aproximadamente el 17 % del área foliar en el primer 1/3 de la planta es amarilla, 8 = unas pocas hojas en el primer 1/3 de la planta comienzan a mostrar sombras/moteado amarillo. El primer 1/3 de la planta se refiere a las hojas más antiguas en la zona del primer 1/3 de la planta, determinada a partir del sistema principal del tallo/radicular de la planta y como se observa en la Figura 2 (rectángulo negro). Las hojas más jóvenes de las matas, más hacia la punta de las matas, no se fenotipan, dado que estas son generalmente verdes en el momento del fenotipado y se vuelven amarillas, solo en las plantas susceptibles, después de varios días más, por ejemplo, 7-10 días después (aunque ya contengan el virus en el momento del fenotipado). Las plantas con una puntuación promedio de resistencia a la enfermedad que es significativamente más alta que la puntuación promedio de la enfermedad de los controles susceptibles, por ejemplo, una puntuación promedio de al menos 3,0, preferentemente de al menos 4,0, más preferentemente de al menos 5,0, de al menos 6,0, de al menos 7,0, de al menos 8,0, muy preferentemente de 9,0, son en el presente documento plantas resistentes a MYaV o plantas que tienen una resistencia a MYaV.

El "ensayo de marcadores de MYaV" es un ensayo de marcadores moleculares que se puede utilizar para probar si en el cromosoma 6 de *C. melo* una introgresión de un melón silvestre, o pariente silvestre del melón que comprende el alelo de MYaV está presente en el genoma (o si en el melón silvestre o los parientes silvestres del melón comprenden la región que comprende QTL *MYaV6.1* en su genoma), mediante la determinación del genotipo de los marcadores de SNP mME15090 y/o mME12135, y/o cualquier marcador específico del genoma de melón silvestre o pariente silvestre del melón entre los marcadores de SNP mME15090 y mME12135, y opcionalmente también A) de uno o más marcadores seleccionados del grupo mME40332, mME28908, mME36531, mME9692, mME50656, o cualquier marcador específico del genoma de *C. melo* silvestre o pariente silvestre del melón entre mME15090 y mME50656, o B) de uno o más marcadores seleccionados del grupo mME21377, mME36533, mME13585, o cualquiera específico del genoma de *C. melo* silvestre o pariente silvestre del melón entre mME21377 y mME13585.

"Melón" o "melón almizcleño" se refiere en el presente documento a plantas de la especie *Cucumis melo*. Los melones o 'melones almizcleños', *Cucumis melo*, se pueden clasificar en: *C. melo cantalupensis*, *C. melo inodorous* y *C. melo reticulatus*. Los *C. melo cantalupensis* también se denominan cantalupos y son principalmente de forma redonda con estrías prominentes y casi sin reticulado. La mayoría tiene una pulpa naranja y dulce, y habitualmente son muy fragantes. En contraste con el melón europeo, el "cantalupo" norteamericano no es de este tipo, pero pertenecen a los melones almizcleños verdaderos. Los *C. melo inodorous* (o melones de invierno) se pueden subdividir en distintos tipos, tal como el melón Honeydew, Piel de sapo, melón Sugar, melón japonés, etc. *C. melo reticulatus* es el melón almizcleño verdadero, que tiene una piel reticulada (con forma de red) e incluye melones Galia, melones Sharlyn y el cantalupo norteamericano.

"Melón cultivado" se refiere a plantas de *Cucumis melo*, es decir, variedades, líneas reproductivas o cultivares de la especie *C. melo*, cultivados por los seres humanos y que tienen buenas características agronómicas, especialmente, producen frutos comestibles y comercializables de buen tamaño, calidad y uniformidad; preferentemente tales plantas no son "plantas silvestres", es decir, plantas que generalmente tienen rendimientos mucho peores y características agronómicas peores que las plantas cultivadas y, por ejemplo, crecen naturalmente en poblaciones silvestres. Las "plantas silvestres" incluyen, por ejemplo, ecotipos, líneas de PI (forma siglada de *Plant Introduction*: introducción vegetal), variedades autóctonas o accesiones silvestres o parientes silvestres de una especie.

El melón y los parientes silvestres del melón es/son diploides y tiene/tienen 12 pares de cromosomas homólogos, numerados del 1 al 12. "Cromosoma 6 de melón" se refiere al cromosoma 6 de *C. melo*, como se conoce en la técnica y como se denomina en la nomenclatura de la ICuGI. El "cromosoma 6 ortólogo" se refiere al cromosoma 6 de parientes silvestres del melón, partes de cual pueden introgresarse en el cromosoma 6 del melón cultivado.

"Melón silvestre" incluye plantas silvestres de la especie *Cucumis melo*, por ejemplo, *C. melo ssp. agrestis*, *C. melo ssp. melo*, *C. melo var. texanus*, *C. melo var. acidulous*, semillas depositadas con el NCIMB 41966, el NCIMB 41969, y otras accesiones de *C. melo* silvestre, como, por ejemplo, variedades autóctonas o accesiones PI que se encuentran en <http://www.ars-grin.gov> u otras colecciones de semillas. Las semillas depositadas con el NCIMB 41966 se obtuvieron de la colección ARS-GRIN y tienen la denominación de origen 'India'. Las semillas depositadas con el NCIMB 41969 se obtuvieron de España y tienen como origen Uzbekistán.

Los "parientes silvestres del melón" incluyen plantas silvestres de otras especies de *Cucumis*, pero que se pueden cruzar con *Cucumis melo* para producir descendencia fértil (opcionalmente, con la ayuda de rescate de embriones, potenciación dependiente de temperatura del crecimiento del tubo polínico o técnicas similares para superar las barreras reproductivas) y de las cuales se pueden obtener fragmentos de cromosomas y transferirlos a *Cucumis melo* (ya sea por cruces interespecíficos con *C. melo* o a través de cruces con una especie que actúa de puente). Ejemplos de parientes silvestres del melón son *C. anguria*, *C. metuliferus*, *Cucumis callosus*, *Cucumis trigonus*, *Cucumis ficifolius*, *C. picocarpus*, *C. zeyheri*, *C. africanus*, *C. meeusei*, *C. prophetarum*, *C. hystrix*, *C. queenslandicus*, y otras especies de *Cucumis* (véase, por ejemplo, Sebastian y col. 2010, PNAS Vol. 107, n.º 32, 14269-14273).

"Promedio" se refiere en el presente documento a la media aritmética.

Un "cromosoma recombinante" se refiere a un cromosoma que tiene una nueva composición genética que surge a través del cruce entre cromosomas homólogos, por ejemplo, un "cromosoma 6 recombinante", es decir, un cromosoma 6 que no está presente en ninguna de las plantas parentales y que surgió a través de un raro evento de entrecruzamiento entre cromosomas homólogos de un par de cromosomas 6. En el presente documento, por ejemplo, se proporciona un cromosoma 6 recombinante de melón que comprende un locus que confiere resistencia a MYaV, o una parte que confiere resistencia del mismo (que comprende un alelo de resistencia *MYaV*).

La expresión "técnicas de mejora genética tradicionales" abarca en el presente documento el cruce, retrocruzamiento, autofecundación, selección, producción de haploides dobles, rescate de embriones, fusión de protoplastos, selección asistida por marcador, mejora genética por mutación, etc., tal como conoce el obtentor de plantas (es decir, procedimientos que no son procedimientos de modificación genética/transformación/transgénicos), mediante los cuales, por ejemplo, se puede obtener, identificar y/o transferir un cromosoma 6 recombinante.

"Retrocruzamiento" se refiere a un procedimiento de mejora genética mediante el cual un rasgo (único), tal como la resistencia a MYaV, puede transferirse desde un acervo genético inferior (por ejemplo, un melón silvestre o un pariente silvestre del melón; también denominado "donante") a un acervo genético superior (también denominado "parental recurrente"), por ejemplo, un melón cultivado. Una descendencia de un cruce (por ejemplo, una planta F1 obtenida cruzando un melón silvestre resistente a MYaV con un melón cultivado susceptible a MYaV; o una planta F2 o una planta F3, etc., obtenida de la autofecundación de F1) se "retrocrucza" con el parental con el acervo genético superior, por ejemplo, con el parental cultivado, susceptible a MYaV. Después de repetidos retrocruces, el rasgo del acervo genético inferior se habrá incorporado al acervo genético superior.

La "selección asistida por marcadores" o "SAM" es un procedimiento de uso de la presencia de marcadores moleculares, que están genéticamente ligados a un locus particular o a una región cromosómica particular (por ejemplo, fragmento de introgresión), para seleccionar plantas por la presencia del locus o región específica (fragmento de introgresión). Por ejemplo, un marcador molecular genéticamente ligado a un locus de resistencia a MYaV, puede utilizarse para detectar y/o seleccionar plantas de melón que comprendan el locus de resistencia a MYaV. Cuanto más cerca esté el ligamiento genético del marcador molecular con el locus (por ejemplo, aproximadamente 7 cM, 6 cM, 5 cM, 4 cM, 3 cM, 2 cM, 1 cM, 0,5 cM o menos), menos probable es que el marcador se disocie del locus mediante recombinación meiótica.

La "puntuación LOD" (logaritmo (en base 10) de probabilidades) se refiere a una prueba estadística que se utiliza a menudo para el análisis de ligamiento en poblaciones animales y vegetales. La puntuación LOD compara la probabilidad de obtener los datos de la prueba si los dos locus (locus de marcadores moleculares y/o un locus de un rasgo fenotípico) están en efecto ligados, a la probabilidad de observar los mismos datos al azar. Las puntuaciones LOD positivas favorecen la presencia de un ligamiento y una puntuación LOD mayor a 3,0 se considera prueba de ligamiento. Una puntuación LOD de +3 indica una probabilidad de 1000 a 1 de que el ligamiento observado no se produjo al azar.

"Propagación vegetativa", "reproducción vegetativa" o "propagación clonal" se utilizan indistintamente en el presente documento y significan el procedimiento de tomar parte de una planta y permitir que esa parte de la planta forme al menos raíces, donde parte de la planta, por ejemplo, se define como o se obtiene de (por ejemplo, cortando) la hoja, polen, embrión, cotiledón, hipocótilo, células, protoplastos, célula meristemática, raíz, punta de la raíz, pistilo, antera, flor, punta de brotes, brote, tallo, fruto, pecíolo, etc. Cuando una planta entera se regenera por propagación vegetativa, también se denomina propagación vegetativa.

"Cultivo celular" o "cultivo de tejidos" se refiere al cultivo *in vitro* de células o tejidos de una planta.

"Regeneración" se refiere al desarrollo de una planta a partir de un cultivo celular o un cultivo de tejidos, o de propagación vegetativa.

"Transgén" o "gen quimérico" se refiere a un locus genético que comprende una secuencia de ADN, tal como un gen recombinante o un cromosoma recombinante o parte del mismo, que se ha introducido en el genoma de una planta de melón por transformación, tal como transformación mediada por *Agrobacterium*. Una planta que comprende un transgén integrado de manera estable en su genoma se denomina "planta transgénica". Un transgén o una planta transgénica también puede contener un cromosoma recombinante completo o parte de un cromosoma recombinante, por ejemplo, la parte que comprende el alelo de MYaV, introducido en el genoma por transformación.

Una "secuencia de ácido nucleico aislada" o "ADN aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ya no se encuentra en el entorno natural del que se aisló, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en una célula hospedadora bacteriana o en el genoma nuclear o plasmídico de la planta.

Una "célula hospedadora" o una "célula hospedadora recombinante" o "célula transformada" son términos que se refieren a una nueva célula (u organismo) individual que surge como resultado de haber introducido en dicha célula al menos una molécula de ácido nucleico. La célula hospedadora es preferentemente una célula vegetal o una célula bacteriana. La célula hospedadora puede contener el ácido nucleico como una molécula replicativa extracromosómica (episómica), o comprender el ácido nucleico integrado en el genoma nuclear o plasmídico de la célula hospedadora, o como un cromosoma introducido, por ejemplo, minicromosoma.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una planta *Cucumis melo* cultivada que comprende resistencia frente al virus asociado al amarilleamiento del melón (MYaV). En particular, la resistencia es conferida por un fragmento de introgresión en el cromosoma 6 del melón, en el que dicho fragmento de introgresión procede de una planta silvestre de la especie *Cucumis melo*.

Los presentes inventores cruzaron dos accesiones distintas de *C. melo*, semillas representativas que se depositaron con el NCIMB 41966 y NCIMB 41969, con una línea reproductiva de melón susceptible a MYaV y con una variedad de melón susceptible, respectivamente, y llevó a cabo el mapeo de QTL, basándose en datos de fenotipado obtenidos de campos infestados por MYaV cerca de Mossoro (Rio Grande do Norte, Brasil).

Sorprendentemente, en ambas poblaciones de mapeo, se encontró en el cromosoma 6 del melón un QTL altamente significativo para la resistencia a MYaV, lo que indicó que distintas accesiones de *Cucumis melo* silvestre comprenden un locus de resistencia a MYaV en el cromosoma 6, que se transfirió a *C. melo* cultivado y confirió resistencia a MYaV a la planta de melón cultivada. En las dos poblaciones de mapeo, el QTL, que se llamó *MYaV6.1*, explicó el 32,6 % y el 91,7 % de la variación fenotípica observada para la resistencia a MYaV y, por lo tanto, es muy significativa.

Debe tenerse en cuenta que cuando se hace referencia en el presente documento a un (un) QTL (*MYaV6.1*) o a un locus que confiere resistencia a MYaV (o una parte que confiere resistencia del mismo) en el cromosoma 6 del genoma de *C. melo*, puede ser que en el cromosoma 6 haya en realidad dos (o más) QTL ligados entre sí, ya que la puntuación LOD tiene dos picos en ambas poblaciones de mapeo (véase la Figura 1). Por lo tanto, la referencia a un QTL o a un locus abarca la posibilidad de que haya dos (o más) QTL o dos (o más) locus acoplados entre sí en el cromosoma 6. Igualmente, en el presente documento la referencia a un fragmento de introgresión en el cromosoma 6 que tiene un QTL o un locus que confiere resistencia a MYaV (o una parte que confiere resistencia del mismo) abarca que el fragmento de introgresión comprenda todos los locus que confieren resistencia, o en casos de fragmentos de introgresión más pequeños, al menos una región de introgresión lo suficientemente grande (con uno, dos o más QTL) como para que el fragmento de introgresión confiera resistencia a MYaV cuando el fragmento de introgresión está en forma heterocigótica u homocigótica en el genoma de *C. melo*. Por tanto, en caso de fragmentos de introgresión más pequeños, el fragmento de introgresión comprende preferentemente al menos el QTL principal (es decir, el mayor de los dos picos del LOD en la Figura 1).

Por tanto, en un aspecto, se descubrió que está presente en el cromosoma 6 de los melones silvestres un locus de rasgo cuantitativo (QTL *MYaV6.1*) que confiere resistencia a MYaV y que este QTL, cuando se transfiere (introgresa) a una variedad o línea reproductiva de melón cultivado susceptible a MYaV, y cuando está presente en forma heterocigótica u homocigótica, confiere resistencia a MYaV a la planta de melón cultivada. El QTL, o el fragmento de introgresión que comprende el QTL (que comprende el alelo de resistencia a MYaV) es, por tanto, dominante, es decir, es suficiente tener el fragmento de introgresión en uno de los cromosomas 6 (un cromosoma 6 recombinante), mientras que el cromosoma 6 homólogo del par puede ser un cromosoma 6 (no recombinante) de *C. melo* cultivado que carece del fragmento de introgresión.

Aunque las fuentes actuales de introgresiones de alelos de resistencia a MYaV son dos fuentes silvestres (NCIMB 41966 y NCIMB 41969, de India y Uzbekistán, respectivamente), probablemente hay otras accesiones de *Cucumis* silvestres que comprenden alelos de MYaV o alelos ortólogos de *MYaV* en el mismo locus en el cromosoma 6. Dichos alelos de MYaV o alelos ortólogos de *MYaV* también se pueden identificar e introgresar en *C. melo* cultivado como se describe en el presente documento, para generar una planta de *C. melo* cultivada que comprenda un genoma de *C. melo* y un cromosoma 6 recombinante, por lo que el cromosoma 6 recombinante comprende un fragmento de introgresión de especies de *Cucumis* silvestre, que confiere un fenotipo de resistencia a MYaV al cultivo a la planta de *C. melo* cultivada cuando está presente en forma homocigótica o heterocigótica.

Las accesiones de melones silvestres y parientes silvestres del melón, tales como accesiones obtenibles de la colección del USDA National Plant Germplasm System u otras colecciones de semillas, pueden cribarse en cuanto a la resistencia a MYaV utilizando ensayos fenotípicos y/o de marcadores de MYaV, y las accesiones resistentes pueden cruzarse con una planta de *Cucumis melo* que carezca de resistencia a MYaV. Después, la generación F2 (o una generación posterior, tal como la F3 o una generación de retrocruzamiento) puede cribarse en cuanto a plantas recombinantes que tengan el fenotipo de resistencia MYaV y/o el fragmento de introgresión o una parte del mismo, utilizando los ensayos de marcadores moleculares descritos en el presente documento.

Plantas, semillas y partes de planta de acuerdo con la invención

Por tanto, en una primera realización se proporciona una planta de *Cucumis melo* cultivada que comprende resistencia frente al virus asociado al amarilleamiento del melón (MYaV).

La presencia de un fenotipo de resistencia MYaV se puede determinar utilizando el ensayo de resistencia a MYaV, por el cual las plantas se criban en cuanto a la resistencia en condiciones naturales de campo en una o más zonas donde la incidencia del MYaV sea alta, tal como el noreste de Brasil. Las plantas de acuerdo con la invención tienen resistencia a MYaV si su puntuación promedio de la enfermedad, en una escala de 9 = hojas totalmente verdes (en el primer 1/3 de la planta) a 1 = hojas totalmente amarillas (en el primer 1/3 de la planta), es significativamente más alta

que la puntuación promedio de la enfermedad de las variedades susceptibles a MYaV, cuando se cultivan en las mismas condiciones ambientales. La puntuación promedio de la enfermedad de las plantas de melón cultivadas resistentes a MYaV es, en un aspecto descrito en el presente documento una realización, de al menos 3, preferentemente de al menos 4, en una escala de 1 = hojas totalmente amarillas a 9 = hojas totalmente verdes, cuando se cultivan en el campo en el noreste de Brasil, o en cualquier otro campo donde la incidencia del MYaV sea alta. En una realización como se establece en las reivindicaciones adjuntas, la puntuación promedio de la enfermedad es al menos de 5, 6, 7, 8 o 9. Se puede ver si la incidencia del MYaV es alta debido a los síntomas graves de amarilleamiento (puntuación de la enfermedad promedio = 1) que se desarrollan en las plantas de control susceptibles, tales como los cultivares Sancho, Amaregal u otros. Alternativamente o además, se pueden determinar los niveles de virus MYaV en el tejido de melón, por ejemplo, utilizando anticuerpos policlonales desarrollados para la detección de MYaV.

Las puntuaciones de la enfermedad promedio se calculan preferentemente basándose en al menos cuatro plantas de una línea o variedad, preferentemente al menos 5, 10, 15, 20 o más plantas cultivadas en las mismas condiciones ambientales.

La resistencia frente al MYaV es conferida por un fragmento de introgresión en el cromosoma 6, en el que el fragmento de introgresión procede de un genoma de melón silvestre. El fragmento de introgresión comprende el locus del rasgo cuantitativo (QTL) denominado en el presente documento *MYaV6.1*, locus que a su vez comprende un alelo de resistencia *MYaV*, o un alelo de resistencia ortólogo de *MYaV*, del gen de resistencia a *MYaV*.

Las plantas de melón cultivadas de acuerdo con la invención, por tanto, tienen un cromosoma 6 recombinante, que comprende un fragmento de introgresión de un cromosoma 6 de melón silvestre.

Como la resistencia es dominante, el fenotipo de resistencia se observa cuando el alelo de resistencia está en forma heterocigótica u homocigótica, las plantas de melón cultivadas de acuerdo con la invención tienen el fragmento de introgresión o la parte que confiere resistencia del mismo, en el cromosoma 6 en forma heterocigótica u homocigótica.

El fragmento de introgresión puede proceder de (o procede de), o es obtenible de (o se obtiene de) una planta silvestre de la especie *Cucumis melo*, que comprende el QTL de *MYaV* (*MYaV6.1*) en el cromosoma 6. Como alternativa, como se describe en el presente documento, el fragmento de introgresión puede proceder de (o procede de), o es obtenible de (o se obtiene de) un pariente silvestre de *Cucumis melo*, que se puede cruzar con *Cucumis melo* (opcionalmente utilizando técnicas de rescate de embriones u otras, para ayudar a la producción de una descendencia viable), para que el fragmento del cromosoma 6 ortólogo pueda introgresarse en el cromosoma 6 de *C. melo*, especialmente *C. melo* cultivado.

En una realización específica, el fragmento de introgresión que comprende el locus de resistencia a *MYaV* puede proceder de (o procede de) o es obtenible de (o se obtiene de) plantas de *C. melo* silvestre, de las que se ha depositado una muestra representativa de semillas con el número de referencia NCIMB 41966 o NCIMB41969. En un aspecto, la invención proporciona una planta de *C. melo* cultivada que comprende resistencia frente a *MYaV*, en la que la resistencia es conferida por un fragmento de introgresión en el cromosoma 6 del melón, en el que dicho fragmento de introgresión (que confiere dicha resistencia a *MYaV*) procede (o se puede obtener de) un cruce de una planta cuyas semillas se depositaron con el número de referencia NCIMB 41966 o NCIMB41969 con una planta de melón cultivada. Ambas accesiones de *C. melo* silvestre tienen un fenotipo de resistencia a *MYaV*, con una puntuación de la enfermedad promedio de 9,0 (las hojas permanecen verdes), en comparación con una puntuación de la enfermedad promedio por debajo de 2,0, o por debajo de 1,5, para las variedades susceptibles de melón, tales como Amaregal F1. El fragmento de introgresión también puede proceder (o procede de) otras plantas de *C. melo* silvestres, que tengan una puntuación de la enfermedad por *MYaV* promedio de al menos 8, más preferentemente de 9, como, por ejemplo, se determina en el ensayo de resistencia a *MYaV*.

En otra realización de la invención se refiere a una planta de la invención, es decir, una planta de *Cucumis melo* cultivada que comprende resistencia frente al virus asociado al amarilleamiento del melón (*MYaV*), en la que dicha resistencia es conferida por un fragmento de introgresión en el cromosoma 6 en forma homocigótica o heterocigótica, y en la que dicho fragmento de introgresión procede de una planta silvestre de la especie *Cucumis melo*, en la que el fragmento de introgresión es idéntico al fragmento que confiere resistencia a *MYaV* en el cromosoma 6 como está presente en las semillas depositadas con el número NCIMB 41966, NCIMB 41969.

El experto en la materia es capaz de identificar e introgresar el QTL *MYaV6.1* que comprende la región encontrada en otras accesiones de melón silvestre u otros parientes silvestres del melón, en *C. melo* cultivado como se explicará más adelante. El experto en la materia también puede identificar otros marcadores moleculares ligados a (asociados con) el QTL, que pueden utilizarse para identificar la presencia de un fragmento de introgresión de otros melones silvestres o parientes silvestres del melón en el cromosoma 6 de *C. melo*. Se descubrió que dos de los marcadores moleculares proporcionados en el presente documento están asociados con el QTL de resistencia a *MYaV*, cuando el fragmento de introgresión se obtuvo de dos fuentes silvestres distintas. Estos dos marcadores también pueden estar ligados a (asociados con) la resistencia a *MYaV* en el cromosoma 6, o en los cromosomas 6 ortólogos y, por tanto, pueden ser útiles para obtener el QTL de distintas fuentes. Como alternativa, el experto en la materia puede identificar otros marcadores moleculares utilizando procedimientos conocidos.

ES 2 983 766 T3

En una realización, la presencia del fragmento de introgresión, o la región del cromosoma 6 (o región del cromosoma 6 ortólogo), que comprende el locus de resistencia a MYaV, es detectable mediante un ensayo de marcadores moleculares que detecta al menos los siguientes dos marcadores de polimorfismo mononucleotídico (SNP):

- a) el genotipo CC o AC para el marcador de SNP mME15090 en la SEQ ID NO: 1 (o la SEQ ID NO: 9);
- 5 b) el genotipo AA o AG para el marcador SNP mME12135 en SEQ ID NO: 3 (o SEQ ID NO: 10),
y detecta además al menos dos de los marcadores de polimorfismo mononucleotídico seleccionados del grupo que consiste en:
 - el genotipo GG o AG para el marcador SNP mME40332 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 2;
 - el genotipo TT o AT para el marcador SNP mME28908 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 4;
 - 10 - el genotipo TT para el marcador SNP mME36531 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 5;
 - el genotipo AA o AT para el marcador SNP mME9692 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 6;
 - el genotipo CC o CT para el marcador SNP mME50656 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 7;o detecta además al menos dos de los marcadores de polimorfismo mononucleotídico seleccionados del grupo que consiste en:
- 15 - el genotipo AA o AG para el marcador SNP mME21377 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 8;
- el genotipo TT o GT para el marcador SNP mME36533 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 11;
- el genotipo TT o CT para el marcador SNP mME13585 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 12.

Como se mencionó, se descubrió que estos dos marcadores de SNP están genéticamente ligados a (o asociados con) el fragmento de introgresión en el cromosoma 6 que comprende el QTLMYaV6.1 en ambas poblaciones de mapeo, es decir, en plantas que comprenden el QTL de resistencia de dos accesiones de melón silvestre distintas.

Por tanto, en una realización, las plantas resistentes al MYaV de acuerdo con la invención comprenden al menos una Citosina (C) (es decir, el genotipo CC o AC) en lugar de dos Adeninas (AA) en el nucleótido 71 de la SEQ ID NO: 1 (o la SEQ ID NO: 9) (denominado marcador de SNP mME15090) y/o comprenden al menos una Adenina (A) (es decir, el genotipo AA o AG) en lugar de dos Guaninas (GG) en el nucleótido 71 de la SEQ ID NO: 3 (o la SEQ ID NO: 10) (denominado marcador de SNP mME12135) como se establece en las reivindicaciones adjuntas. Genotipo de SNP se refiere a dos nucleótidos, y a secuencias genómicas que comprenden uno de estos dos nucleótidos, uno en cada cromosoma 6. Entonces, una planta que tiene un genotipo CC para mME15090 tiene un nucleótido (C) idéntico en ambos cromosomas, mientras que una planta que tiene un genotipo AC para mME15090 tiene un cromosoma con una A en el nucleótido 71 de la SEQ ID NO: 1 y un cromosoma con una C en el nucleótido 71 de la SEQ ID NO: 1.

Como se establece en las reivindicaciones adjuntas, el fragmento de introgresión, o la región del cromosoma 6 (o región del cromosoma 6 ortólogo), que comprende el locus de resistencia a MYaV, es detectable mediante un ensayo de marcadores moleculares que detecta adicionalmente al menos dos marcadores de polimorfismo mononucleotídico (SNP) seleccionados del grupo que consiste en:

- a) el genotipo GG o AG para el marcador de SNP mME40332 en la SEQ ID NO: 2;
 - 35 b) el genotipo TT o AT para el marcador de SNP mME28908 en la SEQ ID NO: 4;
 - c) el genotipo TT para el marcador de SNP mME36531 en la SEQ ID NO: 5;
 - d) el genotipo AA o AT para el marcador de SNP mME9692 en la SEQ ID NO: 6;
 - e) el genotipo CC o CT para el marcador de SNP mME50656 en la SEQ ID NO: 7;
- o detecta además al menos dos marcadores seleccionados del grupo:
- 40 f) el genotipo AA o AG para el marcador de SNP mME21377 en la SEQ ID NO: 8;
 - g) el genotipo TT o GT para el marcador de SNP mME36533 en la SEQ ID NO: 11;
 - h) el genotipo TT o CT para el marcador de SNP mME13585 en la SEQ ID NO: 12.

Por tanto, la planta de melón resistente a MYaV de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos una Guanina (G) (es decir, el genotipo GG o AG) en lugar de dos Adeninas (AA) en el nucleótido 71 de la SEQ ID NO: 2 (denominado marcador de SNP mME40332), y/o al menos una Timina (T) (es decir, el genotipo TT o AT) en lugar de

dos Adeninas (AA) en el nucleótido 71 de la SEQ ID NO: 4 (denominado marcador de SNP mME28908), y/o dos Timinas (TT) (es decir, el genotipo TT) en lugar de dos Citosinas (CC) o en lugar de CT en el nucleótido 71 de la SEQ ID NO: 5 (denominado marcador de SNP mME36531), y/o al menos una Adenina (A) es decir, el genotipo AA o AT) en lugar de dos Timinas (TT) en el nucleótido 71 de la SEQ ID NO: 6 (denominado marcador de SNP mME9692), y/o al menos una Citosina (C) (es decir, el genotipo CC o CT) en lugar de dos Timinas (TT) en el nucleótido 71 de la SEQ ID NO: 7 (denominado marcador de SNP mME50656), y/o al menos una Adenina (A) es decir, el genotipo AA o AG) en lugar de dos Guaninas (GG) en el nucleótido 71 de la SEQ ID NO: 8 (denominado marcador de SNP mME21377), y/o al menos una Timina (T) (es decir, el genotipo TT o GT) en lugar de dos Guaninas (GG) en el nucleótido 71 de la SEQ ID NO: 11 (denominado marcador de SNP mME36533), y/o al menos una Timina (T) (es decir, el genotipo TT o CT) en lugar de dos Citosinas (CC) en el nucleótido 71 de la SEQ ID NO: 12 (denominado marcador de SNP mME13585).

En un aspecto, el fragmento de introgresión, o la región del cromosoma 6 (o región del cromosoma 6 ortólogo), que comprende el locus de resistencia a MYaV, que es detectable mediante los marcadores anteriores, procede de una planta silvestre de la especie *Cucumis melo*, y en un aspecto procede de una planta de la cual se ha depositado una muestra representativa de semillas con los números de referencia NCIMB 41966 y NCIMB 41969, por tanto, el QTL y la región del cromosoma 6 que comprende el QTL, es en un aspecto el QTL como se encuentra en el NCIMB 41966 o en el NCIMB 41969. En un aspecto, el fragmento de introgresión, o el cromosoma 6 recombinante, se obtiene al cruzar una planta cultivada a partir de semillas depositadas con el número de referencia NCIMB 41966 o NCIMB 41969 con otra planta de melón, especialmente una planta de melón cultivada de la especie *C. melo*.

Por tanto, en un aspecto, como se establece en la reivindicación 3 adjunta, la planta de melón resistente a MYaV de acuerdo con la invención comprende un fragmento de introgresión en el cromosoma 6, que se puede obtener a partir de semillas de las que se ha depositado una muestra representativa con el NCIMB 41966 y en el que dicho fragmento de introgresión comprende al menos 6 marcadores de SNP seleccionados del grupo que consiste en:

- a) el genotipo CC o AC para el marcador de SNP mME15090 en la SEQ ID NO: 1;
- b) el genotipo GG o AG para el marcador de SNP mME40332 en la SEQ ID NO: 2;
- c) el genotipo AA o AG para el marcador de SNP mME 12135 en la SEQ ID NO: 3.
- d) el genotipo TT o AT para el marcador de SNP mME28908 en la SEQ ID NO: 4;
- e) el genotipo TT para el marcador de SNP mmME36531 en la SEQ ID NO: 5;
- f) el genotipo AA o AT para el marcador de SNP mME9692 en la SEQ ID NO: 6;
- g) el genotipo CC o CT para el marcador de SNP mME50656 en la SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto, como se establece en la reivindicación 4 adjunta, la planta de melón resistente a MYaV de acuerdo con la invención comprende un fragmento de introgresión en el cromosoma 6, que se puede obtener a partir de semillas de las que se ha depositado una muestra representativa con el NCIMB 41969 y en el que dicho fragmento de introgresión comprende al menos 4 marcadores de SNP seleccionados del grupo que consiste en:

- a) el genotipo AA o AG para el marcador de SNP mME21377 en la SEQ ID NO: 8;
- b) el genotipo CC o AC para el marcador de SNP mME15090 en la SEQ ID NO: 9;
- c) el genotipo AA o AG para el marcador de SNP mME12135 en la SEQ ID NO: 10;
- d) el genotipo TT o GT para el marcador de SNP mME36533 en la SEQ ID NO: 11;
- e) el genotipo TT o CT para el marcador de SNP mME13585 en la SEQ ID NO: 12.

Para obtener el fragmento de introgresión de las semillas depositadas, se cultiva una planta a partir de la semilla y la planta se cruza con una planta susceptible de *C. melo* para obtener semillas F1. La semilla híbrida F1 y las plantas cultivadas a partir de ella, contienen un cromosoma 6 del parental susceptible (sin QTL *MYaV6.1*) y un cromosoma 6 del parental silvestre resistente a MYaV. Para generar eventos de recombinación entre estos dos cromosomas 6 homólogos, debe tener lugar la meiosis y las plantas que comprenden los cromosomas 6 recombinantes deben identificarse. Por ejemplo, la F1 puede autofecundarse para producir plantas F2, y/o las plantas F2 resistentes o plantas F3, etc., puede retrocruzarse con el parental susceptible. Las plantas que son resistentes a MYaV pueden cribarse y seleccionarse en cuanto a, la presencia de uno o más de los marcadores de SNP anteriores, para identificar plantas que comprenden un cromosoma 6 recombinante, que comprenda un fragmento de introgresión que confiere una resistencia a MYaV de las semillas depositadas.

De forma análoga, las plantas de melón cultivadas que comprenden resistencia frente a MYaV, en que la resistencia se confiere mediante un fragmento de introgresión en el cromosoma 6, pueden generarse y/o identificarse utilizando distintos procedimientos. Por ejemplo, para obtener una planta de melón cultivada que comprenda un fragmento de

introgresión que confiere resistencia a MYaV procedente de un melón silvestre o un pariente silvestre del melón, en primer lugar se identifica un melón silvestre o un pariente silvestre del melón que tenga un fenotipo de resistencia MYaV y/o que comprenda uno o más de los marcadores de SNP asociados con la resistencia a MYaV desvelados en el presente documento, por ejemplo, uno cualquiera, o más, o todos los marcadores anteriores. La planta identificada se cruza con una planta susceptible de *C. melo* para obtener semillas F1. La semilla híbrida F1 y las plantas cultivadas a partir de ella, contienen un cromosoma 6 del parental susceptible (sin QTL *MYaV6.1*) y un cromosoma 6 del parental silvestre resistente a MYaV. Para generar eventos de recombinación entre estos dos cromosomas 6 homólogos debe tener lugar la meiosis y las plantas que comprenden los cromosomas 6 recombinantes deben identificarse. Por ejemplo, la F1 puede autofecundarse para producir plantas F2, y/o las plantas F2 resistentes o plantas F3, etc., puede retrocruzarse con el parental susceptible. Las plantas que son resistentes a MYaV pueden cribarse y/o seleccionarse en cuanto a la presencia de uno o más de los marcadores de SNP anteriores, y/o cribarse y/o seleccionarse en cuanto a la presencia del fenotipo de resistencia a MYaV, para identificar plantas que comprendan un cromosoma 6 recombinante que comprenda un fragmento de introgresión que confiere una resistencia a MYaV procedente de un melón silvestre o un pariente silvestre del melón. Como alternativa o además, se puede llevar a cabo el mapeo del QTL para identificar marcadores moleculares adicionales ligados al QTL *MYaV6.1* y/o generar cultivos de plantas de *C. melo* que comprenden un fragmento de introgresión en el cromosoma 6, que confiere resistencia a MYaV.

En un aspecto descrito en el presente documento, la presencia del fragmento de introgresión, o la región del cromosoma 6 (o región ortóloga del cromosoma 6), que comprende el locus de resistencia a MYaV, es detectable mediante un ensayo de marcador molecular que detecta al menos uno de los siguientes marcadores:

- a) el genotipo CC o AC para el marcador SNP mME15090 en SEQ ID NO: 1 (o SEQ ID NO: 9);
- b) el genotipo AA o AG para el marcador SNP mME12135 en SEQ ID NO: 3 (o SEQ ID NO: 10);
- c) cualquier melón silvestre o pariente silvestre del marcador específico del genoma del melón entre el marcador de a) y b).

En un aspecto descrito en el presente documento, se detectan al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o más marcadores a partir de los marcadores de a), b) o c) anteriores. En un aspecto descrito en el presente documento se detecta al menos el marcador de a) y b) y opcionalmente se detecta al menos uno, dos, tres o más marcadores de c).

Cualquier marcador específico del genoma del melón silvestre o pariente silvestre del melón entre el marcador de a) y b) se refiere a cualquier marcador molecular que se mapea genéticamente en la región del cromosoma 6 entre el marcador mME15090 y mME12135 (ver Figura 1) y/ o que se encuentra físicamente entre el marcador mME15090 y mME12135, y que es indicativo de la región del cromosoma 6 del melón silvestre o del pariente silvestre de la región del cromosoma 6 del melón. Esto significa que el marcador es polimórfico entre el genoma del melón cultivado y el genoma del melón silvestre o pariente silvestre del genoma del melón. En un aspecto, el marcador es un polimorfismo mononucleotídico, pero también se pueden usar otros marcadores moleculares tales como RFLP, AFLP, RAPD, secuenciación de ADN, etc.

En otro aspecto descrito en el presente documento, la presencia del fragmento de introgresión, o la región del cromosoma 6 (o región ortóloga del cromosoma 6), que comprende el locus de resistencia a MYaV, es detectable mediante un ensayo de marcador molecular que detecta al menos uno de los siguientes marcadores:

- a) el genotipo CC o AC para el marcador SNP mme15090 en SEQ ID NO: 1 (o SEQ ID NO: 9);
- b) el genotipo CC o CT para el marcador SNP mme50656 en SEQ ID NO: 7;
- c) cualquier melón silvestre o pariente silvestre del marcador específico del genoma del melón entre el marcador de a) y b).

En un aspecto descrito en el presente documento, se detectan al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o más marcadores a partir de los marcadores de a), b) o c) anteriores. En una realización se detecta al menos el marcador de a) y b) y opcionalmente se detecta al menos uno, dos, tres o más marcadores de c).

Cualquier marcador específico del genoma del melón silvestre o pariente silvestre del melón entre el marcador de a) y b) se refiere a cualquier marcador molecular que se mapea genéticamente en la región del cromosoma 6 entre el marcador mME15090 y mME50656 (ver Figura 1).) y/o que se encuentra físicamente entre el marcador mME15090 y mME50656, y que es indicativo de la región del cromosoma 6 del melón silvestre o del pariente silvestre de la región del cromosoma 6 del melón. Esto significa que el marcador es polimórfico entre el genoma del melón cultivado y el genoma del melón silvestre o pariente silvestre del genoma del melón. En un aspecto, el marcador es un polimorfismo mononucleotídico, pero también se pueden usar otros marcadores moleculares tales como RFLP, AFLP, RAPD, secuenciación de ADN, etc.

En un aspecto descrito en el presente documento, los marcadores entre el marcador mME5090 y mME50656 son uno o más marcadores seleccionados del grupo: el genotipo GG o AG para el marcador SNP mME40332 en SEQ ID NO: 2; el genotipo AA o AG para el marcador SNP mME12135 en SEQ ID NO: 3; el genotipo TT o AT para el marcador

SNP mME28908 en SEQ ID NO: 4; el genotipo TT para el marcador SNP mME36531 en SEQ ID NO: 5; y el genotipo AA o AT para el marcador SNP mME9692 en SEQ ID NO: 6.

En aún otro aspecto descrito en el presente documento la presencia del fragmento de introgresión, o la región del cromosoma 6 (o región del cromosoma 6 ortólogo), que comprende el locus de resistencia a MYaV, es detectable mediante un ensayo de marcadores moleculares que detecta al menos uno de los siguientes marcadores:

- a) el genotipo AA o AG para el marcador SNP mME21377 en SEQ ID NO: 8;
- b) el genotipo TT o CT para el marcador SNP mME13585 en SEQ ID NO: 12.
- c) cualquier melón silvestre o pariente silvestre del marcador específico del genoma del melón entre el marcador de a) y b).

En un aspecto descrito en el presente documento, se detectan al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o más marcadores a partir de los marcadores de a), b) o c) anteriores. En una realización se detecta al menos el marcador de a) y b) y opcionalmente se detecta al menos uno, dos, tres o más marcadores de c).

Cualquier marcador específico del genoma del melón silvestre o pariente silvestre del melón entre el marcador de a) y b) se refiere a cualquier marcador molecular que se mapea genéticamente en la región del cromosoma 6 entre el marcador mME21377 y mME13585 (ver Figura 1) y/o que se encuentra físicamente entre el marcador mME21377 y mME13585, y que es indicativo de la región del cromosoma 6 del melón silvestre o del pariente silvestre de la región del cromosoma 6 del melón. Esto significa que el marcador es polimórfico entre el genoma del melón cultivado y el genoma del melón silvestre o pariente silvestre del genoma del melón. En un aspecto, el marcador es un polimorfismo mononucleotídico, pero también se pueden usar otros marcadores moleculares tales como RFLP, AFLP, RAPD, marcadores CASP, secuenciación de ADN, etc.

En un aspecto descrito en el presente documento, los marcadores entre el marcador mME21377 y mME13585 son uno o más marcadores seleccionados del grupo: el genotipo CC o AC para el marcador SNP mME15090 en SEQ ID NO: 9; el genotipo AA o AG para el marcador SNP mME12135 en SEQ ID NO: 10; y el genotipo TT o GT para el marcador SNP mME36533 en SEQ ID NO: 11.

Los marcadores moleculares descritos en el presente documento pueden detectarse de acuerdo con el procedimiento convencional. Por ejemplo, los marcadores de SNP se pueden detectar fácilmente utilizando un ensayo KASP (véase www.kpbioscience.co.uk) u otros ensayos. Se ha desarrollado un ensayo KASP para varios de los SNP en el Ejemplo 3. Para desarrollar el ensayo KASP, se seleccionaron 70 pares de bases corriente arriba y 70 pares de bases corriente abajo del SNP y se diseñaron dos cebadores directos específicos de alelo y un cebador inverso específico de alelo. Véase, por ejemplo, Allen y col. 2011, *Plant Biotechnology J.* 9, 1086-1099, en especial las págs. 097-1098 en cuanto al procedimiento del ensayo KASP.

Por tanto, en un aspecto, los marcadores de SNP y la presencia/ausencia del marcador asociado con el alelo de resistencia a MYaV se determinan utilizando un ensayo KASP, pero igualmente se pueden utilizar otros ensayos. Por ejemplo, de forma opcional, también se puede utilizar secuenciación de ADN.

Se puede llevar a cabo mapeo físico utilizando los BAC (cromosomas artificiales bacterianos) y el desarrollo de marcadores para BAC, para mapear la ubicación física de *MYaV6.1* en el cromosoma 6 y para desarrollar marcadores que se encuentren físicamente entre cualquiera de los marcadores mencionados, y para determinar distancias físicas entre marcadores y/o determinar el tamaño de la introgresión.

El tamaño de un fragmento de introgresión también puede determinarse, por ejemplo, mediante la visualización de la introgresión utilizando imágenes de hibridación fluorescente *in situ* (FISH, forma siglada de *fluorescent in situ hybridization*) (Verlaan y col. 2011, *Plant Journal* 68: 1093-1103).

En una realización de la invención, el fragmento de introgresión que confiere resistencia a MYaV tiene un tamaño igual o inferior a 10 Mb, preferentemente un tamaño igual o inferior a 8 Mb, un tamaño igual o inferior a 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 Mb, más preferentemente incluso inferior, tal como igual o inferior a 500 kb, 400 kb, 300 kb, 200 kb, 100 kb, 50 kb, 25 kb, 20 kb, 15 kb o inferior, pero aún comprende el alelo de resistencia a MYaV y aún confiere resistencia a MYaV a una planta de *C. melo* que de otro modo sería susceptible. La resistencia es conferida por el cromosoma 6 recombinante y el fragmento de introgresión que comprende el alelo de MYaV cuando el fragmento de introgresión está en forma heterocigótica u homocigótica. Las plantas con fragmentos de introgresión más pequeños en el cromosoma 6 pueden generarse al generar nuevas plantas recombinantes a partir de una población de plantas obtenidas de un cruce entre una planta cultivada susceptible a MYaV y un melón resistente a MYaV silvestre. Como alternativa, cuando se identifica una planta de *C. melo* cultivada que tiene un fragmento de introgresión que confiere resistencia a MYaV, el tamaño de la introgresión puede reducirse, por ejemplo, autofecundando esa planta y seleccionando una progenie recombinante que tenga tamaños de introgresión más pequeños.

En el tomate, por ejemplo, el gran fragmento de introgresión en el cromosoma 6 (de aproximadamente 27 cM) de *S. chilense* que comprende el alelo Ty-3 se ha reducido seleccionando una línea de progenie recombinante (LA1931-AL-

F2), que comprende un fragmento de introgresión de *S. chilense* mucho más pequeño (de aproximadamente 6 cM) que comprende a Ty-3 (véase Ji y col. 2007, Mol. Breeding 20: 271-284).

5 La planta de melón cultivada de acuerdo con la invención puede ser endogámica o un híbrido F1. En un aspecto, el híbrido F1 comprende el fragmento de introgresión en forma heterocigótica, es decir, producido al cruzar dos líneas parentales endogámicas, una de las cuales posee el fragmento de introgresión (preferentemente en forma homocigótica, aunque no necesariamente), y recogiendo las semillas híbridas F1 de dicho cruce. El híbrido F1 también puede comprender el fragmento de introgresión en forma homocigótica, es decir, producido al cruzar dos líneas parentales endogámicas, comprendiendo cada una el fragmento de introgresión en forma homocigótica o heterocigótica.

10 La planta de melón cultivada puede ser de cualquier tipo. Preferentemente, tiene buenas características agronómicas y de buena calidad del fruto, tal como un tamaño promedio grande del fruto (al menos de 500 g, 600 g, 700 g, 800 g, 900 g, 1000 g o más), un alto brix promedio de los frutos (por ejemplo, un % de sólidos solubles totales promedio de refractómetro de al menos el 10 %, 12 %, 14 %, 16 %, 18 % o más), muchos frutos producidos por planta, pulpa del fruto firme, etc. El melón cultivado puede ser un *C. melo cantalupensis*, *C. melo inodorous* y *C. melo reticulatus*. Los
15 *C. melo cantalupensis* también se denominan cantalupos y son principalmente de forma redonda con estrías prominentes y casi sin reticulado. La mayoría tiene una pulpa naranja y dulce, y habitualmente son muy fragantes. En contraste con el melón europeo, el "cantalupo" norteamericano no es de este tipo, pero pertenecen a los melones almizcleños verdaderos. Los *C. melo inodorous* (o melones de invierno) se pueden subdividir en distintos tipos, tal como el melón Honeydew, Piel de sapo, melón Sugar, melón japonés, etc. *C. melo reticulatus* es el melón almizcleño
20 verdadero, que tiene una piel reticulada (con forma de red) e incluye melones Galia, melones Sharlyn y el cantalupo norteamericano. Los melones tienen muchos tamaños y formas, entre ellas redonda, ovalada y cilíndrica. La pulpa es en general naranja y bastante dulce, pero algunas variedades de melón y, específicamente, los melones persas, puede tener pulpa verde o blanca. Algunos melones con pulpa verde son bastante dulces, pero la mayoría de los melones con pulpa verde y blanca tienen un sabor menos dulce, pero sí un sabor muy refrescante.

25 Además, se pueden introducir otras resistencias en las plantas de melón de la invención, tal como resistencia a una o más de las siguientes enfermedades: marchitez bacteriana, podredumbre de la raíz, colapso del melón, óxido del melón, oídio, marchitamiento por *Verticillium*, quemadura por azufre, gomosis, mosaico de la sandía, mildiu vellosa, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) raza 0, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) raza 1, *Fusarium oxysporum*
30 f.sp. *melonis* (Fom) raza 2, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) raza 1,2, marchitamiento por *Fusarium* R2, nematodo formador de agallas, antracnosis, mosaico del pepino y mosaico de la calabaza, y/o resistencia a una o más de las siguientes plagas: resistencia a los áfidos, gusano del pepino, tenebriónido de tierra, escarabajo del pepino con bandas, ácaros, escarabajo de occidental manchado del pepino, saltamontes del melón, gusano del melón, escarabajo occidental rayado del pepino o minador del melón. Además, se pueden introducir otros genes de resistencia frente a virus patógenos, hongos, bacterias o plagas.

35 En un aspecto se proporcionan semillas a partir de las cuales se pueden cultivar plantas de la invención. En un aspecto, las semillas son semillas F1 híbridas, que comprenden el cromosoma 6 recombinante en forma homocigótica o heterocigótica, y que tienen un fenotipo de resistencia a MYaV cuando se cultivan en el campo.

40 Además, se proporcionan en el presente documento recipientes y envases que contienen o comprenden semillas a partir de las cuales se pueden cultivar plantas de la invención. Estos pueden etiquetarse como que contienen semillas de melón cultivado que tienen resistencia a MYaV.

45 Además, se proporcionan semillas de progenie y plantas de progenie de plantas, que conservan en el cromosoma 6 la introgresión que confiere resistencia a MYaV, o una introgresión más pequeña, es decir, una parte del fragmento de introgresión que confiere resistencia. La progenie puede ser cualquier generación obtenida por autofecundación de una planta de melón de acuerdo con la invención y/o cruzando una o más veces una planta de melón de acuerdo con
50 la invención con otra planta de melón. La progenie es, por lo tanto, ya sea la generación (semillas) producida a partir del primer cruce (F1) o por autofecundación (S1), o cualquier otra generación producida por cruce y/o autofecundación (F2, F3, etc.) y/o retrocruzamiento (BC1, BC2, etc.) de una o más plantas seleccionadas de la generación F1 y/o S1, y/o BC1 (o plantas de cualquier generación posterior, por ejemplo, la F2) con otra planta de melón. La progenie se selecciona preferentemente para conservar el cromosoma 6 recombinante que comprende el fragmento de
55 introgresión del melón silvestre. Por lo tanto, la progenie también tiene el fenotipo de resistencia a MYaV, preferentemente el mismo nivel de resistencia a MYaV que la planta utilizada en el cruce o autofecundación inicial. La presencia (o retención) del fragmento de introgresión que comprende el QTLMYaV6.1 puede determinarse en el ensayo de resistencia a MYaV, fenotípicamente y/o por el ensayo (o ensayos) de marcadores moleculares descritos en el presente documento. En cuanto a la evaluación fenotípica, obviamente se debe tener en cuenta la naturaleza de
dominancia del alelo MYaV.

60 En un aspecto adicional, se proporcionan partes de las plantas de melón de acuerdo con la invención. Las partes incluyen, por ejemplo, células y cultivos celulares, cultivos de tejidos, tejidos vegetales vegetativos (hojas, raíces, etc.), flores, polen, embriones, frutos, partes de frutos, etc. Las partes de planta comprenden el fragmento de introgresión en el cromosoma 6, como se describe, y como se puede detectar utilizando uno o más de los ensayos de marcadores de MYaV descritos. Además, cuando se regeneran plantas enteras a partir de tales partes de melón, tales como

células, cultivos de células o tejidos, las plantas regeneradas comprenden el cromosoma 6 recombinante y el fenotipo de resistencia MYaV.

5 Por tanto, también se proporciona una célula vegetal, tejido o parte de planta de una planta o de una semilla de acuerdo con la invención que comprende al menos un cromosoma 6 recombinante, en el que dicho cromosoma 6 recombinante comprende un fragmento de introgresión de una planta de *C. melo* silvestre y en el que dicho fragmento de introgresión comprende un alelo que confiere resistencia a MYaV.

10 Además, se abarcan en el presente documento cultivos celulares *in vitro* y cultivos de tejidos *in vitro*, de células o tejidos que comprenden un cromosoma 6 recombinante descrito. Preferentemente, las células o tejidos pueden regenerarse en una planta de melón entera, es decir, las células son células regenerables y los tejidos comprenden células regenerables. Por tanto, también son una realización en el presente documento propagaciones vegetativas de las plantas de acuerdo con la invención. Por tanto, se proporciona una planta de melón cultivada propagada vegetativamente que comprende el fenotipo de resistencia MYaV y un cromosoma 6 recombinante como se describe en el presente documento.

15 En un aspecto específico, se proporciona un fruto de melón cosechado a partir de una planta de acuerdo con la invención. Los frutos de melón comercializables generalmente se clasifican por tamaño y calidad después de la cosecha. Además, se proporcionan recipientes o envases que comprenden o consisten en frutos de melón cosechados. De nuevo, las células de los frutos se pueden distinguir de otros melones por la presencia del cromosoma 6 recombinante (como se puede determinar en uno o más de los ensayos de marcadores moleculares y/o en un ensayo de resistencia a MYaV, por ejemplo, cultivando las semillas presentes en los frutos, o la progenie obtenida autofecundando las plantas cultivadas a partir de las semillas).

20 La invención también proporciona un alimento o producto alimenticio que comprende o que consiste en una parte de planta descrita en el presente documento preferentemente un fruto de melón, o una parte de la misma, y/o un extracto de una parte de planta descrita en el presente documento. La comida o el producto alimenticio puede ser fresco o procesado, por ejemplo, enlatado, al vapor, hervido, frito, escaldado y/o congelado, etc. Por ejemplo, también se proporcionan en el presente documento recipientes tales como latas, cajas, cajones, bolsas, cajas de cartón, envases de atmósfera modificada, películas (por ejemplo, películas biodegradables), etc., que comprende partes de planta tales, como frutos o partes de frutos (frescos y/o procesados), descritas en el presente documento.

Procedimientos y usos descritos en el presente documento

30 En un aspecto adicional descrito en el presente documento, la invención divulga un procedimiento para la producción de una nueva planta de melón cultivada que comprende un fragmento de introgresión que confiere resistencia a MYaV cuando está en forma homocigótica, como se describe. El procedimiento comprende cruzar una planta de la invención, o una planta de progenie de la misma, ya sea como parental masculino o femenino, con una segunda planta de melón (o un pariente silvestre del melón) una o más veces, y/o autofecundar una planta de melón de acuerdo con la invención, o una planta de progenie de la misma una o más veces, y seleccionar la progenie de dicho cruce y/o autofecundación.

35 La primera y/o la segunda planta de melón pueden ser, por ejemplo, una línea o variedad de las especies *C. melo cantalupensis*, *C. melo inodorous* o *C. melo reticulatus*.

Por tanto, se divulga en el presente documento un procedimiento para transferir el cromosoma 6 recombinante, que comprende el locus que confiere resistencia a MYaV (*MYaV6.1*), de una planta de melón (cultivada) a otra planta de melón (cultivada), especialmente a variedades o líneas de reproducción susceptibles a MYaV.

40 El procedimiento comprende las etapas de:

- a) proporcionar una primera planta de melón que comprende al menos un cromosoma 6 recombinante que tiene un fragmento de introgresión que comprende un alelo que confiere resistencia a MYaV en forma homocigótica,
- b) proporcionar una segunda planta de melón, especialmente una planta de melón susceptibles a MYaV,
- c) cruzar dicha planta de melón de a) con dicha planta de melón de b),
- 45 d) recoger semillas F1 híbridas de dicho cruce y, opcionalmente
- e) autofecundar la planta cultivada a partir de dichas semillas F1 híbridas para producir semillas F2, y opcionalmente seleccionar las semillas F2 que tienen el cromosoma 6 recombinante, y opcionalmente
- f) llevar a cabo mejora genética adicional con plantas cultivadas a partir de dichas semillas F2 para producir una planta de melón que tenga buenas características agronómicas y que comprenda el fragmento de introgresión en
- 50 forma homocigótica o heterocigótica.

La presencia o ausencia del cromosoma 6 recombinante y del fragmento de introgresión, puede determinarse mediante uno o más de los ensayos de marcadores moleculares descritos en el presente documento y/o mediante ensayos de resistencia a MYaV. La mejora genética adicional de la etapa f) puede comprender autofecundación, cruce, producción de haploides dobles, retrocruzamiento, etc. En el presente documento se abarcan plantas y semillas obtenibles por el

procedimiento anterior.

Además, se divulga un procedimiento para la producción de plantas F1 híbridas de *C. melo* que comprendan un fenotipo de resistencia MYaV, que comprende:

- 5 a) proporcionar una primera planta de melón endogámica que comprenda al menos un cromosoma 6 recombinante que tiene un fragmento de introgresión que comprende un alelo que confiere resistencia a MYaV,
- b) proporcionar una segunda planta de melón endogámica con o sin cromosoma 6 recombinante que tenga un fragmento de introgresión que comprende un alelo que confiere resistencia a MYaV,
- c) cruzar dicha planta de melón de a) con dicha planta de melón de b),
- d) recoger semillas F1 híbridas de dicho cruce.

10 La planta de melón endogámica de a) y b) puede ser homocigótica y/o heterocigótica para el fragmento de introgresión, y puede contener fragmentos de introgresión de distintos tamaños y/o de distinto origen, es decir, de distintos melones silvestres o parientes silvestres del melón.

Las semillas F1 híbridas comprenden preferentemente al menos un cromosoma 6 recombinante y las plantas F1 cultivadas a partir de las semillas son, por lo tanto, resistentes a MYaV en su fenotipo.

15 La presencia o ausencia del cromosoma 6 recombinante y del fragmento de introgresión, puede determinarse mediante uno o más de los ensayos de marcadores moleculares descritos en el presente documento y/o mediante ensayos de resistencia a MYaV. En el presente documento se abarcan plantas y semillas obtenibles por el procedimiento anterior.

20 En un aspecto distinto se divulga un procedimiento para la producción de una planta de *C. melo* cultivada que comprende un fragmento de introgresión en el cromosoma 6, en el que dicho fragmento de introgresión comprende un alelo de resistencia a MYaV, comprendiendo dicho procedimiento las etapas:

- a) proporcionar una primera planta de melón cultivada que sea susceptible al MYaV,
- b) proporcionar una segunda planta de melón silvestre con resistencia a MYaV,
- c) cruzar dicha planta de melón de a) con dicha planta de melón de b),
- 25 d) recolectar semillas F1 de dicho cruce y realizar un retrocruzamiento de una planta F1 con la planta de melón de a) para producir una población de retrocruzamiento (BC1), o autofecundar dichas plantas F1 una o más veces para producir una población autofecundada de generación F2 o F3 o superior,
- e) opcionalmente retrocruzar una planta de d) una o más veces con la planta de melón de a) para producir una población de retrocruzamiento de mayor generación, y
- 30 f) identificar una generación F2, F3, o autofecundación de generación superior, o BC1 o planta de retrocruzamiento de generación superior que comprende una introgresión en el cromosoma 6, en el que dicho fragmento de introgresión comprende un alelo de resistencia a MYaV.

Cuando se hace referencia a poblaciones de retrocruzamiento en el procedimiento, las poblaciones de retrocruzamiento también pueden ser autofecundadas, es decir, BC1S1, BC1S2, BC2S1, BC2S2 u otras.

35 En una o más de las etapas b) a f), se puede analizar la presencia del alelo de resistencia a MYaV (o el fragmento de introgresión o la región del cromosoma 6 silvestre que comprende el alelo) (y se pueden seleccionar las plantas) llevando a cabo un ensayo de marcadores moleculares como se describe en otra parte en el presente documento, por ejemplo, determinando si la planta comprende el genotipo CC o AC para el marcador de SNP mME15090 en la SEQ ID NO: 1 y el genotipo AA o AG para el marcador de SNP mME12135 en la SEQ ID NO: 3, o cualquier marcador específico del genoma de melón silvestre o de un pariente silvestre del melón entre el marcador mME15090 y mME12135.

40 Utilizando este procedimiento, se pueden generar y/o seleccionar nuevas plantas de melón cultivadas que comprendan una introgresión con el QTL *MYaV6.1* de una fuente silvestre, tal como un melón silvestre o un pariente silvestre del melón (tal como del NCIMB 41966 o NCIMB 41969, u otros melones silvestres o parientes silvestres del melón).

45 En un aspecto, divulgado en el presente documento el procedimiento para la producción de una planta de *C. melo* cultivada que comprende un fragmento de introgresión en el cromosoma 6, en el que dicho fragmento de introgresión comprende un alelo de resistencia a MYaV, que comprende las etapas:

- a) proporcionar una primera planta de melón cultivada que sea susceptible al MYaV,
- b) proporcionar una segunda planta de melón silvestre con resistencia a MYaV,

c) cruzar dicha planta de melón de a) con dicha planta de melón de b),

d) recolectar semillas F1 de dicho cruce y realizar un retrocruzamiento de una planta F1 con la planta de melón de a) para producir una población de retrocruzamiento (BC1), o autofecundar dichas plantas F1 una o más veces para producir una población F2 o F3,

5 e) opcionalmente, autopolinizar la población de retrocruzamiento para producir, por ejemplo, una población BC1S1 o BC1S2,

10 f) identificar una planta F2, F3, BC1 BC1S1 o BC1S2 que comprenda el genotipo CC o AC para el marcador de SNP mME15090 en la SEQ ID NO: 1 y el genotipo AA o AG para el marcador de SNP mME12135 en la SEQ ID NO: 3, o cualquier marcador específico del genoma de melón silvestre o de un pariente silvestre del melón entre el marcador mME15090 y mME12135.

Además, se divulga en el presente documento un procedimiento para identificar una planta de melón silvestre que comprende resistencia a MYaV en el cromosoma 6, comprendiendo dicho procedimiento:

a) proporcionar una accesión de melón silvestre o varias accesiones de melón silvestre;

15 b) cribar dicha accesión (o accesiones) de melón silvestre utilizando un ensayo de marcadores moleculares que detecta al menos un marcador de SNP seleccionado del grupo que consiste en: marcador de SNP mME15090 en la SEQ ID NO: 1 y marcador de SNP mME12135 en la SEQ ID NO: 3; y

20 c) identificar y/o seleccionar una planta de melón silvestre que comprende al menos el genotipo CC o AC para el marcador de SNP mME15090 en la SEQ ID NO: 1 y el genotipo AA o AG para el marcador de SNP mME12135 en la SEQ ID NO: 3 o cualquier melón silvestre o pariente silvestre del marcador específico del genoma del melón entre el marcador mME15090 y mME12135; y, opcionalmente

d) confirmar la resistencia a MYaV en un ensayo de resistencia a MyaV; y opcionalmente

e) introducir dicha resistencia a MYaV de dicha accesión silvestre en melón cultivado.

25 En la etapa c) también se pueden utilizar otras pruebas de marcadores moleculares descritas en otra parte en el presente documento. Con este procedimiento se puede, por tanto, cribar las accesiones de melón silvestre o parientes silvestres del melón en cuanto a la presencia de uno o más de los marcadores y, por tanto, la presencia del QTL *MYaV6.1* e introgresar la parte que confiere resistencia de estas nuevas fuentes de resistencia en plantas de melón cultivadas susceptibles a MYaV. Las plantas y semillas obtenidas mediante este método también son una realización de la invención.

30 En otro aspecto más se divulga un procedimiento para la identificación de una planta de *C. melo* cultivada que comprende un fragmento de introgresión en el cromosoma 6, en el que dicho fragmento de introgresión comprende un alelo de resistencia a MYaV, comprendiendo dicho procedimiento:

a) proporcionar una población de plantas de *C. melo* cultivadas recombinantes (tal como una autopolinización de generación F2, F3 o superior, población de retrocruzamiento de generación BC1, BC2, BC1S1 o superior),

35 b) cribar dicha población utilizando un ensayo de marcadores moleculares que detecta al menos un marcador de SNP seleccionado del grupo que consiste en: marcador de SNP mME15090 en la SEQ ID NO: 1 y marcador de SNP mME12135 en la SEQ ID NO: 3; o cualquier melón silvestre o pariente silvestre del marcador específico del genoma del melón entre el marcador mME15090 y mME12135; y

40 c) identificar y/o seleccionar una planta que comprende al menos el genotipo CC o AC para el marcador de SNP mME15090 en la SEQ ID NO: 1 y el genotipo AA o AG para el marcador de SNP mME12135 en la SEQ ID NO: 3 o cualquier melón silvestre o pariente silvestre del marcador específico del genoma del melón entre el marcador mME15090 y mME12135.

45 En este procedimiento también se pueden utilizar otras pruebas de marcadores moleculares descritas en otra parte en el presente documento. Por tanto, utilizando este procedimiento, se puede detectar la presencia de un fragmento de introgresión en el cromosoma 6 que comprende el QTL *MYaV6.1* en plantas o partes de plantas de melón cultivadas.

En aún otro aspecto se divulga un procedimiento para detectar si una planta de *C. melo* cultivada comprende un fragmento de introgresión en el cromosoma 6, en el que dicho fragmento de introgresión comprende un alelo de resistencia a MYaV, comprendiendo dicho procedimiento:

50 a) proporcionar una planta de *C. melo* cultivada,

b) cribar dicha planta utilizando un ensayo de marcadores moleculares que detecta al menos un marcador de SNP

seleccionado del grupo que consiste en:

marcador de SNP mME15090 en la SEQ ID NO: 1 y marcador de SNP mME12135 en la SEQ ID NO: 3 o cualquier melón silvestre o pariente silvestre del marcador específico del genoma del melón entre el marcador mME15090 y mME12135..

- 5 El cribado de marcadores moleculares obviamente implica obtener material vegetal y analizar el ADN genómico del material en cuanto al genotipo del marcador.

En este procedimiento también se pueden utilizar otras pruebas de marcadores moleculares descritas en otra parte en el presente documento. Por tanto, utilizando este procedimiento, se puede detectar la presencia de un fragmento de introgresión en el cromosoma 6 que comprende el QTL *MYaV6.1* en plantas o partes de plantas de melón cultivadas. Si están presentes uno o más de los marcadores que están ligados al QTL, se puede concluir que la planta comprende un fragmento de introgresión que confiere resistencia a MYaV en el cromosoma 6.

Además, se pueden utilizar los procedimientos y los marcadores descritos en el presente documento para reducir el tamaño del fragmento de introgresión silvestre que comprende el QTL *MYaV6.1*, es decir, para generar y seleccionar recombinantes que tienen un fragmento de introgresión más pequeño en el cromosoma 6, pero que conserven la resistencia a MYaV que confiere parte del fragmento de introgresión. Se pueden desarrollar igualmente marcadores moleculares alternativos ligados a *MYaV6.1* para su uso en cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente.

En un aspecto, se divulga en el presente documento el uso de un cromosoma 6 recombinante que comprende un fragmento de introgresión de una planta de *C. melo* silvestre, comprendiendo dicho fragmento de introgresión un alelo que confiere resistencia a MYaV, para la mejora genética de variedades de melón con resistencia a MYaV.

En un aspecto, se divulga en el presente documento el uso de un cromosoma 6 recombinante que comprende un fragmento de introgresión de una planta de *C. melo* silvestre, comprendiendo dicho fragmento de introgresión un alelo que confiere resistencia a MYaV, para la mejora genética de variedades de melón con resistencia a MYaV, en los que dichos cromosomas 6 recombinantes es el cromosoma 6 recombinante como se encuentra en las semillas depositadas con el número de referencia NCIMB 42113 o NCIMB 42198, o se obtiene de dicho cromosoma 6 recombinante. Por tanto, en un aspecto, se divulga en el presente documento una planta de melón cultivada que comprende un cromosoma 6 recombinante obtenido mediante (obtenible mediante) el cruce de una planta cultivada a partir de semillas depositadas con el número de referencia NCIMB 42113, o NCIMB 42198, o de la progenie de las mismas que conservan el cromosoma 6 recombinante, con otra planta de melón.

En un aspecto, las plantas, células, tejidos y partes de planta de acuerdo con la invención no comprenden el fragmento de introgresión de PI313970, fragmento de introgresión que comprende un QTL de resistencia a CYSDV ligado a al menos un marcador ubicado en el cromosoma equivalente al grupo de ligamiento (GL) 6 de la accesión de melón PI313970 como se describe y reivindica en el documento EP1962578B1. Como se mencionó, en el documento EP1962578B1 el GL6 nombrado de manera arbitraria es el GL VI de la ICuGI de melón, pero corresponde al Grupo de Ligamiento V (GL V) de la ICuGI. En un aspecto, las plantas de melón cultivadas de acuerdo con la invención comprenden un cromosoma 5 (GL V de la ICuGI) y dicho cromosoma 5 no comprende la introgresión de PI313970, introgresión que comprende un QTL de resistencia a CYSDV ligado a al menos un marcador ubicado en el cromosoma equivalente al grupo de ligamiento (GL) 6 de la accesión de melón PI313970 como se describe y reivindica en el documento EP1962578B1.

En otro aspecto divulgado en el presente documento una planta de melón cultivada que comprende un cromosoma 6 recombinante de acuerdo con la invención y que comprende adicionalmente un cromosoma 5 recombinante que comprende una introgresión de PI313970, introgresión que comprende un QTL de resistencia a CYSDV ligado a al menos un marcador ubicado en el cromosoma equivalente al grupo de ligamiento (GL) 6 de la accesión de melón PI313970 como se describe y reivindica en el documento EP1962578B1, es abarcado en el presente documento, una planta de melón cultivada, partes y células de la misma, que comprende al menos dos fragmentos de introgresión del melón silvestre, uno que confiere resistencia a MYaV en el cromosoma 6 (como se describe en la memoria descriptiva) y otro que confiere resistencia a CYSDV al cromosoma 5 (GL V de la ICuGI).

ADN y cromosomas de acuerdo con la invención

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un cromosoma 6 modificado (recombinante) de *C. melo* cultivado, que comprende un fragmento de introgresión de un melón silvestre, como se describe a lo largo de la memoria descriptiva. En un aspecto descrito en el presente documento, el cromosoma 6 recombinante se aísla de su entorno natural. En otro aspecto es una célula vegetal, especialmente una célula de melón, especialmente una célula de *C. melo* cultivado. Además, se describe en el presente documento una parte aislada del cromosoma 6 recombinante que comprende el alelo MYaV.

En un aspecto adicional, se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico recombinante, especialmente una molécula de ADN recombinante, que comprende un *alelo MYaV* de acuerdo con la invención. En un aspecto, el alelo MYaV es detectable por uno o más de los ensayos de marcadores moleculares descritos en el presente documento. Además, se describe en el presente documento un vector de ADN que comprende el ADN

recombinante. La molécula de ADN recombinante o el vector de ADN puede ser una molécula de ácido nucleico aislada. El ADN que comprende el *alelo MYaV* puede estar en un microorganismo, tal como una bacteria (por ejemplo, *Agrobacterium*).

5 Se describe en el presente documento el uso de tal molécula de ácido nucleico (aislada o extraída) y/o de tal cromosoma 6 recombinante o parte del mismo para generar células vegetales y plantas que comprenden un alelo MYaV. En un aspecto descrito en el presente documento puede utilizarse para generar células de melón, plantas de melón y partes de melón transgénicas (por ejemplo, frutos) que comprendan el alelo MYaV, y la planta comprende un fenotipo de resistencia MYaV.

10 Por tanto, también se describen en el presente documento células vegetales transgénicas, por ejemplo, células de melón transgénicas, que comprenden en su genoma un cromosoma 6 recombinante como se describe y/o una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un alelo MYaV. En un aspecto, descrito en el presente documento la molécula de ADN que comprende el alelo MYaV está integrada de manera estable en el genoma del melón.

15 El alelo MYaV también se puede clonar y se puede fabricar un gen quimérico, por ejemplo, uniendo operativamente un promotor expresable en planta al alelo MYaV. Dicho gen quimérico puede introducirse en una célula vegetal y la célula vegetal puede regenerarse en una planta completa para producir una planta transgénica. En un aspecto descrito en el presente documento la planta transgénica es una planta de melón.

Por tanto, en el presente documento se describen plantas transgénicas, especialmente plantas de melón cultivadas transgénicas, que comprenden un alelo de resistencia MYaV y que tienen un fenotipo de resistencia MYaV.

20 De acuerdo con la invención son una realización especialmente células o cultivos celulares que comprenden un cromosoma 6 recombinante, si el cromosoma 6 recombinante se introduce mediante procedimientos de mejora genética. Las células están, por ejemplo, *in vitro* y son regenerables en plantas de melón que comprenden el cromosoma 6 recombinante de la invención.

25 Además, las secuencias de marcadores moleculares (y las moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden la secuencia) divulgadas en el presente documento y los marcadores moleculares entre cualquiera de los marcadores moleculares mencionados descritos en el presente documento y representados en la Figura 1, ligados al QTL que confiere resistencia a MYaV, y su uso en la detección y/o generación de plantas de melón resistentes a MYaV están descritos en el presente documento.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

30 Figura 1: El perfil de LOD de MYaV6.1, un QTL en el grupo de ligamiento de melón VI (GLVI) que confiere resistencia a MYaV. Los mapas de ligamiento del GLVI para los dos cruces [(990631-2)-Q-1-K x NCIMB41966 y Amaregal x NCIMB41969] están representados por barras rellenas, y los marcadores de SNP y las distancias en cM (centiMorgan) están en los lados derecho e izquierdo de las barras, respectivamente. Los marcadores de SNP comunes entre los dos mapas se indican con líneas de conexión. El perfil de LOD en el mapa de (990631-2)-Q-1-K x NCIMB41966 muestra los resultados de las evaluaciones de campo de las familias F3 reproducidas en 2010, mientras que el de Amaregal x NCIMB41969 muestra los resultados de 2011 de las evaluaciones de campo de las plantas F2. El LOD máximo para el cruce (990631-2)-Q-1-K x NCIMB41966 fue de 6,3, lo que explica el 32,6 % de la variación observada en 2010. El LOD máximo del cruce Amaregal x NCIMB41969 fue de 50,3, lo que explica el 91,7 % de la variación observada en 2011.

40 Figura 2: Fotografía tomada en Brasil de la variedad de melón susceptible Hibrix (fila central) que muestra síntomas de MYaV. El rectángulo muestra la parte de la planta de melón que se fenotipa para detectar los síntomas.

Depósitos de semillas

45 Nunhems B.V. depositó una muestra representativa de semillas de accesiones de melón silvestre que comprenden el QTL (designado MYaV6.1) para la resistencia a MYaV en el cromosoma 6 el 2 de mayo de 2012 en la NCIMB Ltd. (Edificio Ferguson, Craibstone Estate, Bucksburn Aberdeen, Escocia AB21 9YA, Reino Unido) de acuerdo con el Tratado de Budapest, a tenor de la Solución del Experto (EPC 2000, Norma 32 (1)). Las semillas recibieron los siguientes números de depósito: NCIMB 41966 y NCIMB 41969.

50 Nunhems B.V. depositó una muestra representativa (2600) de semillas (BC1S2) de una planta de melón cultivada que comprende el QTL para la resistencia a MYaV en el cromosoma 6 en forma homocigótica (designado MYaV6.1) el 15 de febrero de 2013 en la NCIMB Ltd. (Edificio Ferguson, Craibstone Estate, Bucksburn Aberdeen, Escocia AB21 9YA, Reino Unido) de acuerdo con el Tratado de Budapest, a tenor de la Solución del Experto (EPC 2000, Norma 32 (1)). Las semillas recibieron el siguiente número de depósito: NCIMB 42113.

55 Nunhems B.V. depositó una muestra representativa (1300) de semillas (BC4F2) de una planta de melón cultivada que comprende el QTL para la resistencia a MYaV en el cromosoma 6 en forma homocigótica (designado MYaV6.1) el 12 de diciembre de 2013 en la NCIMB Ltd. (Edificio Ferguson, Craibstone Estate, Bucksburn Aberdeen, Escocia AB21

9YA, Reino Unido) de acuerdo con el Tratado de Budapest, a tenor de la Solución del Experto (EPC 2000, Norma 32 (1)). Las semillas recibieron el siguiente número de depósito: NCIMB 42198.

5 El solicitante solicita que las muestras del material biológico y cualquier material obtenido del mismo solo se entreguen a un Experto designado en conformidad con la Norma 32(1) de la EPC o la legislación relacionada de países o tratados que tengan normas y regulaciones similares, hasta la indicación de la concesión de la patente, o durante 20 años a partir de la fecha de presentación si la solicitud es rechazada, retirada o considerada como retirada.

10 El acceso al depósito estará disponible durante la tramitación de la presente solicitud para las personas que el Director de la Oficina de Patentes de Estados Unidos determine que tienen derecho a solicitarlo. Sometido a 37 C.F.R. § 1.808(b), todas las restricciones impuestas por el depositante sobre la disponibilidad al público del material depositado se eliminarán de manera irrevocable al otorgar la patente. El depósito se mantendrá durante un período de 30 años, o 5 años después de la solicitud más reciente, o durante la vigencia exigible de la patente, lo que sea más largo, y se reemplazará si en algún momento se vuelve no viable durante ese período. El solicitante no renuncia a ningún derecho otorgado a tenor de la presente patente en esta solicitud o a tener de la Ley de Protección de Variedades Vegetales (7 USC 2321 y siguientes).

15 Los siguientes Ejemplos no limitantes describen cómo se pueden obtener plantas que comprenden un cromosoma 6 recombinante. A menos que se indique lo contrario en los Ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo de acuerdo con protocolos convencionales como se describen en Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; y en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel y col. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, EE.UU. Los materiales y procedimientos convencionales para el trabajo molecular en plantas se describen en *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) por R.D.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (RU) y Blackwell Scientific Publications, RU. Los procedimientos de mejora genética convencionales se describen en 'Principles of Plant breeding', Segunda edición, Robert W. Allard (ISBN 0-471-02309-4).

25 **Ejemplo 1 - Resistencia en el cromosoma 6 de NCIMB 41966**

1. 1 Material y procedimientos

1.1.1 Desarrollo de las poblaciones F2 y F3

30 Se realizó un cruce entre la línea de reproducción (990631-2) -Q-1-K, que es susceptible a MYaV, y una accesión de melón silvestre, *Cucumis melo* ssp. *agrestis*, obtenida de los EE. UU. pero originaria de la India, cuyas semillas depositó Nunhems B.V. con el número de referencia NCIMB 41966.

La progenie F1 obtenida del cruce se autofecundó para obtener una población F2, que se utilizó para el genotipado (se genotiparon 96 plantas F2). Las plantas F2 se autofecundaron para obtener familias F3, que se fenotiparon en un ensayo de resistencia a MYaV en el campo, cerca de Mossoro, Brasil, en 2010, como se describe a continuación.

1.1.2 Ensayo de resistencia a MYaV de las familias F3

35 Los ensayos de resistencia a MYaV se realizaron en 2010 en campo abierto cerca de Mossoro, a una alta incidencia natural de MYaV. Cada familia F3 se plantó en tres repeticiones de 20 plantas por repetición, en 2010, junto con controles susceptibles (4 plantas, 3 repeticiones) y el control resistente NCIMB41966 (20 plantas). Se utilizó un diseño aleatorizado completo, dado que la presión de la enfermedad fue uniforme en todo el campo.

40 Los controles susceptibles fueron Glory F1 (Origene Seeds), Ruidera F1, Amaregal F1, Guapore, Goldex, DRY9150 y Sancho (Syngenta).

El fenotipado de los síntomas de MYaV se realizó de forma visual, cuando los controles susceptibles mostraron claros síntomas de amarilleamiento.

45 Cada planta recibió una puntuación de enfermedad en la siguiente escala, mediante la cual solo se utilizan las hojas más antiguas, es decir, el primer tercio (1/3) de la planta alrededor del tallo principal y el sistema de raíces. Por tanto, al referirse en el presente documento a "todas las hojas" o "pocas hojas" o un determinado porcentaje del área foliar total, solo se hace referencia a las hojas en el 1/3 más antigua de la planta, véase también la Figura 2, donde el rectángulo negro indica el 1/3 de la planta que se puntúa de acuerdo con la siguiente escala:

9	Totalmente verde (todas las hojas en el 1/3 más antiguo de la planta son verdes)
8	Pocas hojas (en el 1/3 más antiguo de una planta) comienzan a mostrar sombras/moteado amarillo

(continuación)

7	Hasta aproximadamente el 17 % del área foliar total (en el 1/3 más antiguo de una planta) es amarilla
6	Aproximadamente del 17 % al 32 % del área foliar total (en el 1/3 más antiguo de una planta) es amarilla
5	del 33 % al 48 % del área foliar total (en el 1/3 más antiguo de una planta) es amarilla
4	del 49 % al 64 % del área foliar total (en el 1/3 más antiguo de una planta) es amarilla
3	del 65 % al 80 % del área foliar total (en el 1/3 más antiguo de una planta) es amarilla
2	del 81 % al 99 % del área foliar (en el 1/3 más antiguo de la planta) es amarilla
1	Totalmente amarilla (todas las hojas en el 1/3 más antiguo de la planta son amarillas)

La puntuación de la enfermedad promedio se calculó por familia F3 y por control.

1.1.3 Genotipado de familias F2

- 5 El genotipado de las familias F2 se realizó utilizando la matriz Illumina Infinium de SNP (polimorfismo de un único nucleótido), que contiene 4600 SNP. Además se analizaron algunos marcadores SSR (repeticiones de secuencia simples) de la ICuGI y sirvieron como marcadores de anclaje junto con algunos otros marcadores de SNP de anclaje, para determinar el número y la orientación del grupo de ligamiento.

1.1.4 Análisis de datos de los datos del genotipo F2 y del fenotipo F3

- 10 El mapeo de ligamiento se realizó utilizando JoinMap v4 y el análisis de QTL se realizó con el programa informático MapQTL v5.

1.2 Resultados

1.2.1 Resultados del ensayo de resistencia a MYaV en 2010

Los resultados de las verificaciones de susceptibles y resistentes se muestran a continuación:

Variedades de verificación de susceptibles a MYaV	Puntuación promedio de amarilleamiento
Glory	2
Ruidera	1,44
Amaregal	1,29
Guapore	1
Goldex	1
DRY 9150	1
Variedades de verificación de susceptibles a MYaV	Puntuación promedio de amarilleamiento
Sancho	1
NCIMB41966	9

1.2.2 Resultados del mapeo del QTL de familias F2 y F3

- 15 Los marcadores de SNP mapearon en 12 grupos de ligamiento, correspondientes al número de cromosomas haploide del melón.

Para los datos de fenotipo de 2010 se encontró un QTL significativo para la resistencia a MYaV en el grupo de ligamiento VI (basado en la nomenclatura de la ICuGI), con una puntuación de LOD máxima de 6,3 y que explica el 32,6 % de la variación fenotípica observada para la resistencia a MYaV.

- 20 Los resultados se muestran en la Figura 1.

Los siguientes marcadores de SNP se asociaron con el fenotipo de resistencia MYaV. También se indica en la Tabla el genotipo del parental resistente y del susceptible en el locus del marcador.

Tabla 1

NMID	SNP	Parental susceptible: (990631-2)-Q-1-K	Parental resistente NCIMB 41966	Puntuación de LOD (datos de 2010)	SEQ ID NO:
mME15090	[A/C]	AA	CC	1,33**	1
mME40332	[A/G]	AA	GG	2,20**	2
mME12135	[A/G]	GG	AA	5,30	3
mME28908	[A/T]	AA	TT	5,26	4
mME36531	[C/T]	TC	TT	3,44	5
mME9692	[A/T]	TT	AA	3,13	6
mME50656*	[C/T]	TT	CC	1,43**	7

* corresponde al marcador de EST A_38-F04 (referencia de GenBank AM730270), que se utilizó para ligar el mapa genético del grupo de ligamiento VI al mapa físico (armazón 00021). Véase García-Mas y col., junio de 2012, PNAS Early Edition, página 1-6, Apéndice de información complementaria - Figura S2.
** a pesar de que la puntuación de LOD es inferior a 3,0, estos marcadores todavía se consideran significativos, según lo confirmado utilizando datos de fenotipado distintos obtenidos en 2009 (resultados no mostrados)

Ejemplo 2 - Resistencia en el cromosoma 6 de NCIMB 41969

2. 1 Material y procedimientos

2.1.1 Desarrollo de la población F2

- 5 Se realizó un cruce entre la variedad híbrida de melón Galia Amaregal F1, que es susceptible a MYaV, y una accesión de melón silvestre, obtenida de España pero originaria de la India, cuyas semillas depositó Nunhems B.V. con el número de referencia NCIMB 41969.

10 La progenie F1 obtenida del cruce se autofecundó para obtener una población F2, la cual se utilizó para genotipado (181 plantas F2). Las plantas F2 se fenotiparon en un ensayo de resistencia a MYaV en el campo, cerca de Mossoro, Brasil, en 2011, como se describe a continuación.

2.1.2 Ensayo de resistencia a MYaV de plantas F2

Los ensayos de resistencia a MYaV se realizaron en 2011 en campo abierto cerca de Mossoro, a una alta incidencia natural de MYaV.

- 15 Los controles susceptibles (10 plantas por parcela) fueron Amaregal (Nunhems), Sancho (Syngenta) y Caribbean Gold. Además, se incluyó el NCIMB 41969 como verificación de resistentes (20 plantas por parcela).

El fenotipado de los síntomas de MYaV se realizó de forma visual, cuando los controles susceptibles mostraron claros síntomas de amarilleamiento.

Cada planta recibió una puntuación de enfermedad en la escala descrita anteriormente en 1.1.2.

La puntuación de la enfermedad promedio se calculó por línea o variedad vegetal.

20 2.1.3 Genotipado de familias F2

El genotipado de las plantas F2 se realizó utilizando un conjunto genómico amplio de 96 marcadores en una plataforma KASP para el mapa de armazón inicial. Además se analizaron algunos marcadores SSR (repeticiones de secuencia simples) de la ICuGI y sirvieron como marcadores de anclaje junto con algunos otros marcadores de SNP de anclaje, para determinar el número y la orientación del grupo de ligamiento.

25 2.1.4 Análisis de datos de los datos del genotipo F2 y del fenotipo F2

El mapeo de ligamiento se realizó utilizando JoinMap v4 y el análisis de QTL se realizó con el programa informático MapQTL v5.

2.2 Resultados

2.2.1 Resultados del ensayo de resistencia a MYaV en 2011

Los resultados de las verificaciones de susceptibles y resistentes se muestran a continuación:

Variedades de verificación de susceptibles a MYaV	Puntuación promedio de amarilleamiento
Amaregal	1
Sancho	1
Caribbean Gold	1

Verificación de resistente a MYaV	Puntuación promedio de amarilleamiento
NCIMB41969	9

2.2.2 Resultados del mapeo del QTL de plantas F2

- 5 Los marcadores de SNP mapearon en 12 grupos de ligamiento, correspondientes al número de cromosomas haploide del melón.

Se encontró un QTL significativo para la resistencia a MYaV en el grupo de ligamiento VI (basado en la nomenclatura de la ICuGI), con una puntuación de LOD máxima de 50,3 y que explica el 91,7 % de la variación fenotípica observada para la resistencia a MYaV.

- 10 Los resultados se muestran en la Figura 1.

Los siguientes marcadores de SNP se asociaron con el QTL. También se indica en la Tabla el genotipo del parental resistente y del susceptible en el locus del marcador.

Tabla 2

NMID	SNP	Parental susceptible:	Parental resistente NCIMB 41969	Puntuación de LOD (datos de 2011)	SEQ ID NO:
mME21377	[A/G]	GG	AA	6,81	8
mME15090	[A/C]	AA	CC	17,14	9
mME12135	[A/G]	GG	AA	24,86	10
mME36533	[G/T]	GG	TT	7,64	11
mME13585	[C/T]	CC	TT	6,58	12

- 15 Los anteriores Ejemplos 1 y 2, muestran que un fragmento de introgresión de melones silvestres, que comprende un locus que confiere resistencia a MYV, confiere resistencia a MYaV cuando se transfiere al melón cultivado. Dado que el QTL mapeó en el grupo de ligamiento 6, el QTL se denominó *MYaV6.1*. Se han depositado semillas de tales plantas de melón cultivadas que comprenden el QTL denominado *MYaV6.1*, con el número de depósito NCIMB 42113 (que comprenden el fragmento de introgresión de NCIMB 41969) y NCIMB 42198 (que comprenden el fragmento de introgresión de NCIMB 41966).

- 20 El QTL *MYaV6.1* se encontró en dos accesiones de melón silvestre, de orígenes distintos (India y Uzbekistán), y se encontró que dos marcadores de SNP (mME12135 y ME15090) estaban comúnmente ligados al QTL en ambas poblaciones, mientras que cinco marcadores de SNP (mME40332, mME28908, mME36531, mME9692 y mME50656) y tres marcadores de SNP (mME21377, mME36533 y mME13585) estaban asociados con (ligados a) el QTL obtenido de NCIMB41966 y NCIMB41969, respectivamente.

- 25 Uno o más (al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más), o todos los marcadores de SNP asociados con *MYaV6.1* proporcionados en el presente documento, pueden utilizarse para diversos fines, tal como

a) para detectar la presencia de un fragmento de introgresión en el cromosoma 6 que comprende el QTL *MYaV6.1* en plantas o partes de plantas de melón cultivadas;

- 30 b) para transferir el cromosoma 6 recombinante, que comprende el locus que confiere resistencia a MYaV (*MYaV6.1*), de un melón cultivado a otras plantas de melón cultivadas, especialmente variedades o líneas de reproducción susceptibles a MYaV;

c) para generar y/o seleccionar nuevas plantas de melón cultivadas que comprendan una introgresión con el QTL *MYaV6.1* de una fuente silvestre, tal como un melón silvestre o un pariente silvestre del melón (tal como del NCIMB 41966 o NCIMB 41969, u otros melones silvestres o parientes silvestres del melón),

5 d) para reducir el tamaño del fragmento de introgresión silvestre que comprende el QTL *MYaV6.1*, es decir, para generar y seleccionar recombinantes que tienen un fragmento de introgresión más pequeño en el cromosoma 6, pero que conserven la resistencia a MYaV que confiere parte del fragmento de introgresión;

e) para desarrollar marcadores moleculares alternativos para cualquiera de los fines mencionados anteriormente, ligados a *MYaV6.1*;

10 f) para cribar las accesiones de melón silvestre o parientes silvestres del melón en cuanto a la presencia de uno o más de los marcadores y, por tanto, la presencia del QTL *MYaV6.1* y para introgresar la parte que confiere resistencia de estas nuevas fuentes de resistencia en plantas de melón cultivadas susceptibles a MYaV.

Ejemplo 3 - Ensayos de SNP (ensayo KASP) o "ensayo de marcadores de MYaV"

15 Para cribar plantas en cuanto a la presencia de uno o más de los marcadores moleculares anteriores, ligados al fragmento de introgresión que confiere resistencia a MYaV, se desarrolló un ensayo KASP (un ensayo de genotipado de SNP o ensayo de genotipado de PCR específica de alelo de KBioscience) para los marcadores de SNP mME21377, mME1590, mME12135, mME36533, mME13585 y mME36531.

20 Basándose en las secuencias genómicas que comprenden el SNP (véase la Tabla 3 a continuación y el listado de secuencias), para cada marcador de SNP se desarrollaron dos cebadores directos específicos de alelo (es decir, que detectan el nucleótido del parental susceptible o resistente en el locus del SNP) y un cebador inverso común (en *cursiva*), indicados en la Tabla 3 y 4 (todas las secuencias se dan en dirección 5' a 3').

Tabla 3
Secuencia genómica para el diseño del cebador (dirección de 5' a 3')

marcador	SNP	Secuencia genómica para el diseño del cebador (dirección de 5' a 3')
mME12135	[A/G]	TGCCAGCCGGCACCGTTTCATCTTTTGGTAATAACTATTAAGCATAGGAAGCAIGTCCTGGAGGGAGTAAAGGGGAICTGTAACAAACCGGACC CTGTT GAATGGAAACGGCAATCAGCCTGTCTTCACCCACAAGCATAGTCCA [SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 10]
mME36531	[C/T]	CTGTTGAAATATATATGCCGTTATTTCTTGGAAATTTGCTGTCAAATCCCTGIGTITATGACIGSSICICTT TTTGTTAGGCTACSCIGAGGA CCAGCTCGTCTACTGTTGGGCTGCATGTACGCCGCTAGACT [SEQ ID NO: 5]
mME21377	[A/G]	TGTATCAGGAACATAGCCAGCTGCTTTCATCTTCTGCGCAACGCTCCCAAGCATGTAGATTTCCTTG[A/G]CTTGGAGGGTGGAGATGTATCGG CACCG AGAAACATATGTGCTTTGCCATTTATCTCGATCCAACCTGCAACC [SEQ ID NO: 8]
mME15090	[A/C]	CATTATGATATCTTCTCAACTCAACCATGAACCTAAAGCACCATTCCCATCTTTCATCTTTGGGTAA[G]GCTCGCAAGGCTGTAGAGTAGG ATACGGGAGACAGATTAGGCCTTTCTTGGGCATCTCTCAAGAATGC [SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 9]
mME36533	[G/T]	CTATAATACCTTCAATAAATAACATGCATACATACATACATGATGATAATATAGASAGAGACAAGGATAGCT[G]TAAAGTTTAGTAGTTTTGAAGATGT GAAYTCTCGATTTTATCTACTACACTGTTGAATGGAATCCTTTTCT [SEQ ID NO: 11]
mME13585	[C/T]	CATATTAATCTTFAAATAATAAACCACATAAATTAATAATTAATAATGAACCTAAAACCTACCCCTATTTTA[C]TGGCTTACAAAACCTTATCTAATGTA TGCCTCATTTAATATTTTTGGTTGATACTTTCATTTATTTT [SEQ ID NO: 12]

Tabla 4

marcador	SNP	Cebador - alelo FAM (colorante)	Cebador - alelo VIC (colorante)	Sonda FAM	Sonda VIC	Cebador común
mME12135	[A/G]	<u>GAAGGTGACCAAGTTTCAT</u> <u>GCTGGGCGGCTTGGTTAC</u> <u>GATCCT</u>	<u>GAAGGTGCGGAGTCAACGG</u> <u>ATTGGTGGCGCTTGGTTACG</u> <u>ATCC</u>	T	C	<u>AGGAAGCATGTGCCTT</u> <u>GAAGGGAGTT</u>
mME36531	[C/T]	<u>GAAGGTGACCAAGTTTCAT</u> <u>GCICAAATCCGTGTTAT</u> <u>TGACTGGTCTC</u>	<u>GAAGGTGCGGAGTCAACGG</u> <u>ATTCAAATCCGTGTTATGG</u> <u>ACTGGTCTT</u>	c	T	<u>GGTCCCTCAGCGGTAG</u> <u>ACCTAACAAA</u>
mME21377	[A/G]	<u>GAAGGTGACCAAGTTTCAT</u> <u>GCTGGCGATACATCTCAC</u> <u>CCTCAAGT</u>	<u>GAAGGTGCGGAGTCAACGG</u> <u>ATTCCGATACATCTCACCC</u> <u>TCAAGC</u>	T	c	<u>GCAACGCCCTCCAAGA</u> <u>ACATGTAGAT</u>
mME15090	[A/C]	<u>GAAGGTGACCAAGTTTCAT</u> <u>GCTACICTACAGCCCTTGC</u> <u>GAGCI</u>	<u>GAAGGTGCGGAGTCAACGG</u> <u>ATTACTCTACAGCCCTTGC</u> <u>AGCG</u>	T	G	<u>CTAAAGCACCATTCC</u> <u>CATCTTTCATCTTT</u>
mME36533	[G/T]	<u>GAAGGTGACCAAGTTTCAT</u> <u>GCTAGATTTCACATCTTCA</u> <u>AACTACTAAACTTC</u>	<u>GAAGGTGCGGAGTCAACGG</u> <u>ATTGAGATTTCACATCTTCAA</u> <u>AACTACTAAACTTAA</u>	c	A	<u>CATGGATAATATAGA</u> <u>GAGAAGACAAGGATA</u>
mME13585	[C/T]	<u>GAAGGTGACCAAGTTTCAT</u> <u>GCTGCATACATTAGATAA</u> <u>GAGTTTGTAAAGCG</u>	<u>GAAGGTGCGGAGTCAACGG</u> <u>ATTAGCATACATTAGATAAG</u> <u>AGTTTGTAAAGCA</u>	G	A	<u>TTAAATTGAACIAAAA</u> <u>CTACCCCTATTTTAA</u>

ES 2 983 766 T3

Utilizando los cebadores anteriores, Los ensayos KASP pueden llevarse a cabo de acuerdo con protocolos convencionales desarrollados por KBioscience.co.uk (véase www.kbioscience.co.uk), para detectar la presencia del genotipo de SNP resistente o susceptible en forma homocigótica o heterocigótica en el ADN vegetal obtenido de células o tejidos de melón. Si el genotipo en un SNP dado es homocigótico, solo se detectará una señal fluorescente. Si el genotipo de la planta en un SNP dado es heterocigótico, se detectará una señal fluorescente mixta.

Para cualquiera de los otros marcadores de SNP, por ejemplo, mME40332, mME28908, mME9692 y mME50656, para detectar el genotipo de SNP se pueden desarrollar ensayos de genotipado de SNP similares.

REIVINDICACIONES

1. Una planta de *Cucumis melo* cultivada que comprende resistencia contra el virus asociado al amarilleamiento del melón (MYaV), en la que dicha resistencia es conferida por un fragmento de introgresión en el cromosoma 6 en forma homocigota o heterocigota y en la que dicho fragmento de introgresión es de una planta silvestre de la especie *Cucumis melo*, cuya planta silvestre tiene una puntuación promedio de enfermedad por MYaV de al menos 8, en una escala de 1 = hojas totalmente amarillas a 9 = hojas totalmente verdes cuando se cultiva en un área infestada por MYaV y en la que dicho fragmento de introgresión se puede obtener cruzando una planta de la cual las semillas se depositaron según NCIMB 41966 o NCIMB 41969 con una planta de melón cultivada y en las que el fragmento de introgresión es detectable mediante un ensayo de marcador molecular que detecta los dos siguientes marcadores de polimorfismo mononucleotídico (SNP):
- 5 a) el genotipo CC o AC para el marcador SNP mME15090 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 1;
- b) el genotipo AA o AG para el marcador SNP mME12135 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 3.
- y detecta además al menos dos de los marcadores de polimorfismo mononucleotídico seleccionados del grupo que consiste en:
- 15 - el genotipo GG o AG para el marcador SNP mME40332 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 2;
- el genotipo TT o AT para el marcador SNP mME28908 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 4;
- el genotipo TT para el marcador SNP mME36531 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 5;
- el genotipo AA o AT para el marcador SNP mME9692 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 6;
- el genotipo CC o CT para el marcador SNP mME50656 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 7;
- 20 o detecta además al menos dos de los marcadores de polimorfismo mononucleotídico seleccionados del grupo que consiste en:
- el genotipo AA o AG para el marcador SNP mME21377 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 8;
- el genotipo TT o GT para el marcador SNP mME36533 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 11;
- el genotipo TT o CT para el marcador SNP mME13585 en el nucleótido 71 de SEQ ID NO: 12.
- 25 2. La planta de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha planta tiene una puntuación promedio de enfermedad por MYaV de al menos 3 en una escala de 1 = hojas totalmente amarillas a 9 = hojas totalmente verdes cuando se cultiva en un área infestada por MYaV.
3. La planta de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicho fragmento de introgresión se puede obtener a partir de semillas de las cuales se ha depositado una muestra representativa según NCIMB 41966 y en la que dicho
- 30 fragmento de introgresión comprende al menos seis marcadores SNP seleccionados del grupo que consiste en:
- a) el genotipo CC o AC para el marcador SNP mME15090 en SEQ ID NO: 1;
- b) el genotipo GG o AG para el marcador SNP mME40332 en SEQ ID NO: 2;
- c) el genotipo AA o AG para el marcador SNP mME12135 en SEQ ID NO: 3.
- d) el genotipo TT o AT para el marcador SNP mME28908 en SEQ ID NO: 4;
- 35 e) el genotipo TT para el marcador SNP mME36531 en SEQ ID NO: 5;
- f) el genotipo AA o AT para el marcador SNP mME9692 en SEQ ID NO: 6;
- g) el genotipo CC o CT para el marcador SNP mME50656 en SEQ ID NO: 7.
4. La planta de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicho fragmento de introgresión se puede obtener a partir de semillas de las cuales se ha depositado una muestra representativa según NCIMB 41969 y en la que dicho
- 40 fragmento de introgresión comprende al menos cuatro marcadores SNP seleccionados del grupo que consiste en:
- a) el genotipo AA o AG para el marcador SNP mME21377 en SEQ ID NO: 8;
- b) el genotipo CC o AC para el marcador SNP mME15090 en SEQ ID NO: 9;
- c) el genotipo AA o AG para el marcador SNP mME12135 en SEQ ID NO: 10;
- d) el genotipo TT o GT para el marcador SNP mME36533 en SEQ ID NO: 11;

ES 2 983 766 T3

- e) el genotipo TT o CT para el marcador SNP mME13585 en SEQ ID NO: 12.
5. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha planta es un híbrido F1.
6. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho fragmento de introgresión tiene un tamaño igual o inferior a 10 Mb, preferiblemente igual o inferior a 8 Mb de tamaño.
- 5 7. Semillas a partir de las cuales se puede cultivar una planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
8. Un fruto de melón cosechado de una planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Una célula vegetal, tejido o parte vegetal de una planta o de una semilla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende al menos un cromosoma 6 recombinante, en la que dicho cromosoma 6 recombinante comprende dicho fragmento de introgresión procedente de una planta silvestre de *C.melo* y en la que dicho fragmento de introgresión comprende dicho alelo que confiere resistencia a MYaV.
- 10

Figura 1

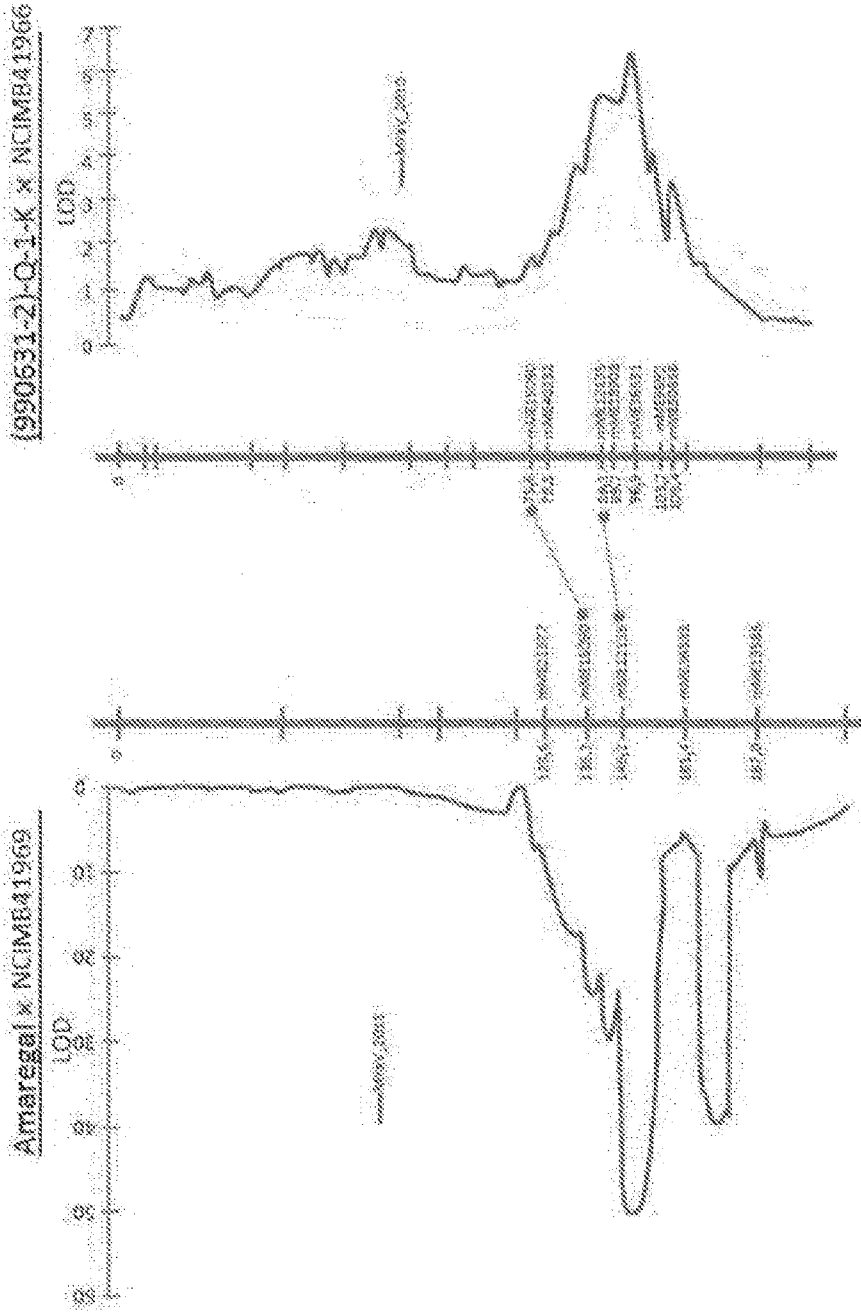


Figura 2

