

## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 42754 B2** (51) Cl. internationale : **A01H 5/08; A01H 1/04; A01H 5/10; A01H 1/04; C12Q 1/68**
- (43) Date de publication : **31.10.2022**

- 
- (21) N° Dépôt : **42754**
- (22) Date de Dépôt : **28.12.2016**
- (30) Données de Priorité : **30.12.2015 EP 15307186.5**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/EP2016/082740 28.12.2016**
- (71) Demandeur(s) : **VILMORIN & CIE, 4, quai de la Mégisserie 75001 PARIS (FR)**
- (72) Inventeur(s) : **PAZ, Zahi ; COHEN, Emanuel ; BEN-ISRAEL, Imri**
- (74) Mandataire : **CABINET CHARDY**

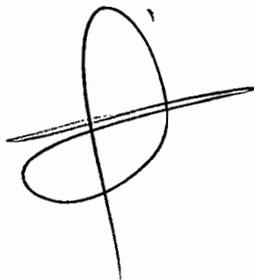
- 
- (54) Titre : **RÉSISTANCE AU VIRUS TOLCNDV DU MELON**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne des plants et graines de melon, notamment de *C. melo* subsp. *melo*, résistants à ToLCNDV, comprenant dans leur génome, des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* conférant une résistance audit virus, lorsqu'elles sont présentes de manière homozygote. Les séquences introgressées sont de préférence caractérisées par des allèles définis de SNP sur le chromosome 11, entre autres un allèle A de SNP Melon\_sbg\_14207\_58 (SEQ ID No : 9). Les séquences introgre

ABRÉGÉ

## RESISTANCE DES MELONS AU VIRUS ToLCNDV

5

La présente invention concerne une plante et une semence de melon, à savoir de *C. melo* subsp. *melo*, résistant au ToLCNDV, comprenant dans leur génome des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* conférant une résistance audit virus, 10 lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote. Les séquences introgressées sont, de préférence, caractérisées par des allèles définis de SNP sur le chromosome 11, entre autres, l'allèle A de SNP Melon\_sbg\_14207\_58 (SEQ ID N°9). Les séquences introgressées peuvent être choisies parmi celles présentes dans le génome d'un plant de ToLR1, de numéro d'ordre 15 la descendance, l'utilisation de ces plantes pour introgresser la résistance dans un autre patrimoine génétique, ainsi que les différentes méthodes d'obtention des plantes ou des semences de melon résistantes.



(P.V. 42754)

CINQUANTE HUITIÈME ET DEANTE FELLET  
RABAT, LE 27-06-2018

## RESISTANCE DES MELONS AU VIRUS ToLCNDV

5 La présente invention concerne la résistance et / ou la tolérance des plants de *Cucumis melo* subsp. *melo* aux géminivirus, en particulier, aux bégomovirus, et, entre autres, au virus Tomato leaf curl New Delhi (ToLCNDV) (virus New Delhi des feuilles enroulées de la tomate). Selon l'invention, la résistance est assurée par des séquences d'ADN, introgressées de *Cucumis melo* subsp. *agrestis* var. *acidulus* en des loci spécifiques du génome d'un plant de *Cucumis melo* subsp. *melo*. Les séquences introgressées peuvent être présentes à l'état homozygote ou  
10 hétérozygote dans le génome de *Cucumis melo* subsp. *melo*, et lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote, elles confèrent une résistance auxdits virus.

Arrière-plan de l'invention

15 *Cucumis melo* appartient à la famille des cucurbitacées. La famille des Cucurbitacées comporte environ 100 genres et 700 à 900 espèces en fonction des auteurs, surtout dans les tropiques. La famille inclut la citrouille, la courge, le potiron, la pastèque, la luffa et plusieurs plantes nuisibles. Le genre *Cucumis*, auquel appartiennent le cantaloup, le concombre, et plusieurs melons, comprend environ 70 espèces. *Cucumis melo* inclut une grande variété de plantes  
20 cultivées, très probablement originaire d'Afrique de l'Est.

Le melon a été divisé en deux sous-espèces, selon la pilosité de l'hypanthium : *Cucumis melo* subsp. *melo* avec des poils longs et étalés sur l'ovaire ou le jeune fruit et *Cucumis melo* subsp. *agrestis* avec des poils courts et dressés (Kirkbride, 1993). On trouve des espèces botaniques appartenant à *Cucumis melo* subsp. *agrestis* en Asie du sud est, de l'Inde au Japon, tandis que  
25 *Cucumis melo* subsp. *melo* est plus répandu de l'Inde à l'Europe et dans le nouveau monde. Alors que les croisements entre espèces différentes sont stériles, les croisements au sein de la même espèce sont généralement fertiles, donnant une grande variété de plantes très voisines.

*Cucumis melo* subsp. *melo* comprend 11 variétés : *cantalupensis* (cantaloup), *reticulatus*  
30 (melon brodé), *adana*, *chandalak*, *ameri*, *inodorus* (melon d'hiver), *flexuosus* (melon arménien), *chate*, *tibish*, *dudaim* et *chito* (melon mango, melon de jardin) (Pitrat et coll. 2000)

Le *Cucumis melo* subsp. *agrestis* comprend 5 groupes différents : *conomon* (melon à l'orientale), *makuwa*, *chinensis*, *momordica* et *acidulus*.

*Cucumis melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* sont généralement des plantes monoïques avec  
35 des fruits ovales ou elliptiques, lisses, avec une peau de couleur verte ou orange, uniforme ou avec des points. La chair est blanche, très ferme et croquante, sans sucre ni arôme.

*Cucumis melo* est une espèce diploïde simple avec douze paires de chromosomes extrêmement différenciés. Le génome du *Cucumis melo* inclut une séquence de plus de 375

Mb, avec un nombre de gènes codant pour des protéines, estimé à 27 427 (Garcia-Mas *et coll.*, 2012).

De nombreux pathogènes affectent la productivité des plants de melon, dont les virus, les champignons, les bactéries, les nématodes, et les insectes. Les melons sont *entre autres*  
5 sensibles à plusieurs virus, et la résistance aux virus est donc d'une grande importance en agriculture.

La structure taxonomique de la famille des Geminiviridae inclut certains des plus importants virus des plantes qui causent de graves maladies dans les cultures agricoles, horticoles et les plantes ornementales. Les géminivirus sont généralement caractérisés par une particule virale  
10 formée de deux icosaèdres accolés. Les géminivirus sont des virus de plantes qui présentent des génomes à ADN simple brin circulaire ambisens. Le génome peut être soit monopartite et constitué d'un seul segment de 2500 à 3000 nucléotides, soit bipartite, et constitué alors de deux segments de taille similaire. Ils ont généralement une capsid géminée, allongée, formée par l'union de deux icosaèdres incomplets (T=1) réunis par le sommet manquant. Les capsides ont  
15 de 18 à 20 nm de diamètre et environ 30 nm de long. Les virus à génome bipartite du genre Bégomovirus ont leur génome réparti en deux particules séparées qui doivent généralement être transmises ensemble pour créer une infection dans une cellule. Les géminivirus sont transmis par des cicadelles (mastrevirus et curtovirus), par des espèces d'aleurodes (bégomovirus), ou par des cérèses (topocovirus).

20 Ces géminivirus sont responsables de dommages significatifs dans de nombreuses cultures dans le monde. Les maladies provoquées par ces virus sont reconnues depuis longtemps comme limitant la culture de plusieurs plantes importantes, telles que maïs, manioc, haricot, courge, cucurbitacées, et tomate. Des épidémies de virose à géminivirus surviennent sous l'effet de divers facteurs, dont la recombinaison de différents géminivirus co-infectant une plante, qui  
25 permet l'apparition de nouveaux virus originaux et parfois virulents. Parmi les autres facteurs, on peut citer le transport de matériel végétal infecté, vers de nouveaux lieux, l'expansion de l'agriculture dans de nouvelles zones, et la migration des insectes vecteurs qui peuvent diffuser le virus d'une plante à l'autre.

Les géminivirus comprennent une famille étendue et diverse de virus qui infectent une grande  
30 variété d'espèces monocotylédones et dicotylédones cultivées, et causent d'importantes pertes de rendements. Les géminivirus sont classés en quatre genres : Mastrevirus (par ex : virus de la striure du maïs, Curtovirus (par ex : virus de l'enroulement apical de la betterave), Bégomovirus (par ex : virus de l'enroulement de la feuille de courge), et Topocovirus (par ex : virus du pseudo-enroulement de la tomate).

35 Le genre Bégomovirus contient plus de 200 espèces virales (Fauquet *et coll.*, 2008) et appartient à la structure taxonomique de la famille des Geminiviridae. Ce groupe de virus de plantes possède une gamme très étendue d'hôtes végétaux. Les hôtes naturels des bégomovirus sont des espèces de plantes dans lesquelles le virus peut se répliquer, causer

une infection systémique, et s'encapsider, puis des virions sont ingérés et transmis à un hôte sensible par la mouche blanche (Funayama, 2001). Ces virus sont responsables au niveau mondial de dommages économiques importants chez plusieurs plantes très cultivées comme la tomate, le haricot, la courge, le manioc et le cotonnier, dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique, d'Afrique et d'Asie. Les bégomovirus provoquent le rabougrissement des plantes, l'enroulement et le jaunissement des feuilles, et limitent fortement la production en fruit (Saeed et coll. 2007). Sur le plan morphologique, les particules de bégomovirus sont non enveloppées. La nucléocapside est de 38 nm de long et 15-22 nm de diamètre. Bien que les particules présentent une symétrie icosaédrique de base, elles comportent deux icosaèdres incomplets réunis par le sommet manquant. Chaque nucléocapside comprend 22 capsomères. L'espèce bégomovirus possède un ADN simple brin circulaire. La plupart des bégomovirus ont un génome bipartite, à savoir que le génome est réparti en deux segments (désignés ADN A et ADN B) ordonnés en particules séparées. Les deux segments doivent généralement être transmis ensemble pour créer une infection symptomatique dans une cellule d'une plante-hôte, mais l'ADN B dépend pour sa réplication de l'ADN A, qui peut, pour certains bégomovirus, causer apparemment des infections propres.

Le bégomovirus New Delhi des feuilles enroulées de la tomate (ToLCNDV) peut causer des pertes importantes dans plusieurs cultures. Il a été décrit pour la première fois sur les tomates en Inde, en 1995, mais il a été signalé ensuite comme provoquant des dommages dans des cultures de cucurbitacées, d'abord dans d'autres pays d'Asie, puis récemment, en Europe : en septembre 2012, des symptômes ont été observés sur la courge en Espagne, au début, dans la région de Murcie, ensuite, à partir de mai 2013, dans la province d'Almería, non seulement sur la courge, mais également sur le melon et la citrouille. Les symptômes se manifestaient par un enroulement et une mosaïque jaune intense des feuilles, des entre-nœuds très courts, une rugosité de la peau des fruits, et leur craquèlement longitudinal, entraînant des pertes catastrophiques.

Les méthodes actuelles de prévention et de lutte contre les géminivirus incluent la lutte contre la propagation des insectes vecteurs qui véhiculent le virus, le développement de plantes transgéniques exprimant la protéine de la capsid virale, et l'utilisation de méthodes de production classiques pour développer des plantes résistant naturellement au virus. Les plantes résistant à la maladie, développées par sélection classique, permettent de lutter plus efficacement, en toute sécurité et de manière plus économique, contre de nombreuses maladies des cultures.

Islam et coll. ont signalé en 2011 une résistance dominante monogénique dans une lignée d'éponge végétale luffa (*Luffa cylindrica* M. Roem). Cependant, il n'a pas été démontré que cette résistance pouvait être transférable au melon.

Lopez et coll. ont mené en 2015 les premiers criblages, publiés, de matériel génétique de cucurbitacées pour identifier des sources de tolérance. De manière générale, toutes les sources

de *Cucumis melo* subsp. *melo* ont montré des symptômes modérés à très sévères et une charge virale intermédiaire à élevée, indiquant qu'il s'agissait de sources inappropriées pour la recherche de telles résistances.

*Cucumis melo* subsp. *agrestis* a donné des résultats plus intéressants, puisque trois accessions  
5 de *Cucumis melo* subsp. *agrestis* var. *momordica* et certaines accessions sauvages en provenance d'Inde, du Ghana, du Sénégal et du Zimbabwe ne présentaient aucun symptôme ou seulement des symptômes modérés. Deux des *Cucumis melo* subsp. *agrestis* var. *momordica* tolérants avaient déjà été sigalés comme résistants à des potyvirus et été utilisés pour introgresser ces résistances dans le melon du commerce.

10 *Cucumis melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* n'a cependant pas été retenu comme source possible par ces auteurs car, après l'apparition tardive des symptômes, ceux-ci ont évolué de modérés à sévères.

De plus, compte tenu des caractéristiques que présente la chair des plantes *Cucumis melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, à savoir, couleur blanc/vert, valeur Brix faible, présence de fibres,  
15 craquèlement, absence de réticulation, pas de changement de couleur avant la maturité, ces accessions constituaient un partenaire d'introgression particulièrement peu prometteur.

Malgré un travail intensif à cet égard, et l'importance actuelle de la production de melon dans le monde, aucun plant de *Cucumis melo* subsp. *melo* résistant ou tolérant au ToLCNDV n'a été  
20 obtenu par introgression de la caractéristique à partir d'une espèce sauvage.

Il existe donc un besoin important dans l'art d'identifier une source monogénique fiable de résistance et / ou de tolérance qui pourrait ensuite être utilisée pour obtenir des plants de *Cucumis melo* subsp. *melo* du commerce résistants.

25 La présente invention fournit des plants de *C. melo* subsp. *melo* possédant une résistance et / ou une tolérance au virus Tomato leaf curl New Delhi (ToLCNDV), ainsi que des méthodes de production ou d'identification de plants de melon affichant une résistance et / ou une tolérance au virus Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), voire à d'autres gémivirus. La présente invention décrit également des marqueurs génétiques moléculaires, en particulier les SNP, liés  
30 au locus génétique récessif, qui confèrent résistance et / ou tolérance au ToLCNDV.

#### Résumé :

Les présents inventeurs ont identifié un *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* sauvage qui possède une résistance élevée au ToLCNDV, et ont pu introgresser dans le patrimoine  
35 génétique du *C. melo* subsp. *melo* les séquences *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* conférant une résistance au ToLCNDV, et obtenir des plants résistants de *Cucumis melo* subsp. *melo*. La résistance décrite dans la présente invention est transmise par les séquences nouvellement découvertes conférant une résistance, ladite résistance étant de nature récessive

et monogénique. Ladite résistance est facilement transférable à différents patrimoines génétiques, en raison de sa nature monogénique. En outre cette résistance peut être transférée sans caractères négatifs liés, en particulier, sans être liée à des caractères commerciaux négatifs, tels que mauvaise qualité de la chair ou faible valeur Brix inférieure à 6 ou 7.

- 5 La présente invention fournit donc ces séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* pour conférer, lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote, le phénotype de résistance/tolérance au ToLCNDV. L'invention fournit également des plants de *Cucumis melo* subsp. *melo* présentant une résistance importante aux géminivirus, en particulier, une résistance au ToLCNDV, ainsi que des méthodes qui permettent de produire ou d'identifier des
- 10 plants ou des populations de *Cucumis melo* subsp. *melo* (matériel génétique) qui présentent une résistance à l'infection par le ToLCNDV, ainsi que des semences, fruits et autres parties de plantes, tels que pollen et ovules contenant les séquences introgressées conférant la résistance. La présente invention décrit également des marqueurs génétiques moléculaires, en particulier des SNP, liés aux séquences introgressées conférant la résistance, à savoir au locus
- 15 de résistance, également appelé gène de résistance, qui est de nature récessive.

Définitions :

Le terme "**Valeur brix**" ou "**brix**" indique la teneur en solide soluble d'une solution aqueuse, *inter alia* d'un jus, la plus grande majorité étant constituée de sucres. Un réfractomètre permet de mesurer la teneur en sucres en degrés Brix. Plus le degré est élevé, plus la teneur en sucres est importante. La mesure du degré Brix est importante pour évaluer le goût des melons, car en tant que fruit, une faible valeur Brix, implique une faible teneur en sucres et une dépréciation de la part du consommateur.

Le terme "**Résistance**" est défini par la section culture végétale et ornementale de l'ISF (fédération internationale des semences) pour décrire la réaction des plantes aux nuisibles ou pathogènes, et aux agressions abiotiques dans l'industrie des semences végétales.

On entend plus particulièrement par résistance la capacité d'une variété végétale à restreindre la croissance et le développement d'un nuisible ou d'un pathogène spécifique et / ou les dommages causés par celui-ci, comparé à des variétés végétales sensibles dans des conditions environnementales et une pression exercée par des nuisibles ou des pathogènes similaires.

Les variétés résistantes peuvent présenter des symptômes de maladies ou des dommages sous une forte pression des nuisibles ou des pathogènes.

Le terme '**Tolérance**' est utilisé ici pour indiquer un phénotype de plante dans lequel les symptômes de maladie restent absents à l'exposition de ladite plante à une dose infectieuse de virus, tandis que la présence d'une infection locale ou systémique, la multiplication du virus, au moins la présence de séquences génomiques virales dans des cellules de ladite plante et / ou une intégration génomique desdites séquences peuvent être établis. Les plantes tolérantes résistent donc à l'expression des symptômes, mais sont porteuses du virus sans manifester de symptômes. Parfois, des séquences virales peuvent être présentes, voire, se multiplier chez des plantes sans provoquer de symptômes de maladie.

**Sensibilité** : Incapacité d'une plante à limiter la croissance et le développement d'un nuisible ou d'un pathogène spécifié.

Une plante *Cucumis melo* subsp. *melo* sensible au ToLCNDV est, par exemple, la variété *C. melo* subsp. *melo* Vedrantaï, disponible dans le commerce. Avant la présente invention, toutes les variétés de melons disponibles dans le commerce étaient sensibles au ToLCNDV.

Une plante selon la présente invention a donc une résistance au ToLCNDV au moins améliorée par rapport aux variétés Vedrantaï, et, plus généralement, par rapport aux variétés de melon du commerce. La résistance présentée dans l'invention est une résistance au ToLCNV, en particulier, aux souches sévères, donnant lieu à des symptômes plus sévères.

Dans le présent document, le terme « **descendance** » ou « **plante descendante** » désigne une plante résultant d'une reproduction sexuée ou végétative d'une ou de plusieurs plantes parentales, ou des descendants. Par exemple, une plante descendante peut être obtenue en clonant ou auto-fécondant une plante parente ou en croisant deux plantes parentes, en incluant des auto-fécondations, ainsi que les générations F1 ou F2 ou encore d'autres générations. Une

F1 est un descendant de première génération produit à partir de parents, dont au moins un est utilisé pour la première fois comme donneur d'un caractère, tandis que le descendant de seconde génération (F2) ou de générations ultérieures (F3, F4, etc.) sont des spécimens produits à partir d'auto-fécondations de F1, F2, etc. Une F1 peut donc être (et l'est  
5 généralement) un hybride résultant d'un croisement entre deux parents reproducteurs vrais (la reproduction vraie est à l'état homozygote pour un caractère), alors qu'une F2 peut être (et l'est généralement) un descendant résultant d'une auto-pollinisation desdits hybrides F1.

Dans le présent document, le terme « **croiser** », « **croisement** » « **pollinisation croisée** » ou « **reproduction croisée** » désigne le processus par lequel le pollen d'une fleur d'une plante est  
10 appliqué (artificiellement ou naturellement) à l'ovule (stigmate) d'une fleur sur une autre plante. Dans le présent document, le terme « **gène** » désigne un segment d'ADN associé à une fonction biologique. Les gènes incluent donc, mais sans y être limité, des séquences codantes et/ou les séquences régulatrices nécessaires à leur expression. Les gènes peuvent également inclure des segments d'ADN non exprimés qui forment, par exemple, des séquences de  
15 reconnaissance pour d'autres protéines. Les gènes peuvent être obtenus à partir de plusieurs sources, y compris le clonage à partir d'une source d'intérêt ou la synthèse à partir de données de séquençage connues ou prévues, et peuvent inclure des séquences désignées pour avoir des paramètres désirés.

Dans le présent document, le terme « **génotype** » désigne la composition génétique d'une  
20 cellule individuelle, d'une culture cellulaire, d'un tissu, d'un organisme (p. ex., une plante), ou d'un groupe d'organismes.

Dans le présent document, le terme « **hétérozygote** » désigne une cellule ou plante individuelle diploïde ou polyploïde ayant différentes allèles (formes d'un gène ou de séquences donné(es)) présents au moins en un locus.

25 Dans le présent document, le terme « **hétérozygote** » désigne la présence de différentes allèles (formes d'un gène ou de séquences donné(es)) présents en un locus particulier.

Dans le présent document, des chromosomes **homologues**, ou des **homologues**, désigne l'ensemble d'un chromosome maternel et d'un chromosome paternel qui s'apparient pendant la méiose. Ces copies ont les mêmes gènes dans les mêmes loci et la même position du  
30 centromère.

Dans le présent document, le terme « **homozygote** » désigne une cellule ou plante individuelle ayant les mêmes allèles en un ou plusieurs loci sur tous les chromosomes homologues.

Dans le présent document, le terme « **état homozygote** » désigne la présence d'allèles identiques en un ou plusieurs loci dans des segments chromosomiques homologues.

35 Dans le présent document, le terme « **hybride** » désigne toute cellule, tissu ou plante individuel(le), résultant d'un croisement entre des parents dont un ou plusieurs gènes diffèrent.

Dans le présent document, le terme « **locus** » (au pluriel : "loci") désigne tout site défini de manière génétique. Un locus peut être un gène ou une partie d'un gène ou une séquence

d'ADN, qui peut être occupé par différentes séquences. Un locus peut également être défini par un SNP (polymorphisme d'un seul nucléotide), ou par plusieurs SNP.

L'invention comprend des plantes de différents niveaux de ploïdie, plante diploïde, mais également plante triploïde, tétraploïde, etc.

- 5 Par **introgression**, on entend l'infiltration des gènes ou de séquences génomiques d'une espèce ou de sous-espèces dans le patrimoine génétique d'une autre à partir d'un hybride interspécifique initial entre ces espèces ou sous-espèces.

10 Description détaillée de l'invention :

La présente invention concerne des plantes *C. melo* subsp. *melo* qui manifestent une résistance importante aux géminivirus, et plus particulièrement, une résistance au ToLCNDV, ainsi que des méthodes qui produisent ou identifient des plantes *C. melo* subsp. *melo* affichant une résistance à l'infection par le ToLCNDV. La présente invention décrit également des marqueurs

- 15 génétiques moléculaires, en particulier des SNP, liés aux loci de résistance.

On notera que, alors que le phénotype d'intérêt selon l'invention est principalement désigné, dans la présente description, comme étant la « résistance » au ToLCNDV ou aux géminivirus, l'invention concerne la résistance et / ou la tolérance au ToLCNDV ou aux géminivirus, dans la mesure où, en fonction des conditions d'infection spécifiques, les deux phénotypes peuvent être

20 observés sur les plantes. Dans tous les cas, pour les plantes de l'invention, il y a cependant au moins des conditions d'infection dans lesquelles le phénotype peut être classé comme résistance selon la définition donnée par l'ISF ci-dessus. Les plantes de l'invention peuvent également se comporter comme porteuses saines, sous certaines conditions.

- La résistance et/ou tolérance selon l'invention est de préférence en réponse à tout type
- 25 d'infection, que ce soit une infection naturelle ou une inoculation mécanique et, dans tous les cas une résistance et / ou une tolérance à l'infection naturelle par le ToLCNDV.

- La résistance et / ou tolérance selon l'invention se caractérise de préférence par l'absence de tous les symptômes généralement associés à l'infection par le ToLCNDV, en particulier par le ToLCNDV sévère, à savoir que les feuilles de la partie supérieure de la plante montrent une
- 30 mosaïque jaune, un flétrissement et un rabougrissement de la plante à l'exposition au virus, dans les conditions d'infection naturelles.

- Les semences et les plantes selon l'invention ont été obtenues à partir d'un croisement intersous-espèces initial entre un plant de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* H-MLCND-32, partenaire d'introgression affichant le phénotype d'intérêt, et un plant d'une lignée pure de *C.*
- 35 *melo* subsp. *melo* Vedrantaï, parent sensible récurrent. Les semences de lignées pures recombinantes, phénotypées dans l'exemple 10 de la section expérimentale, dérivant de ce croisement initial, résistant à l'état homozygote au ToLCNDV, appelées ToLR1, ont été déposées par les inventeurs auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB 42506 le 23

décembre 2015. Les plantes cultivées à partir de ces semences sont résistantes au ToLCNDV, et possèdent de plus un fruit de forme ronde ou ronde-ovale, une valeur Brix d'au moins 9 et une chair de couleur orange, avec éventuellement des taches de couleur crème.

5 Selon un premier aspect, la présente invention concerne une plante ou une semence *C. melo* subsp. *melo*, résistant et / ou tolérant au ToLCNDV, comprenant dans son génome un intervalle ou des séquences introgressé(es) de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* conférant ladite résistance et / ou tolérance au ToLCNDV. Lesdites séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* ne confèrent la résistance à une plante ou semence *C. melo* subsp. *melo* que lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote dans le génome de *C. melo* subsp. *melo*.  
10 L'invention concerne également une cellule de cette plante ou semence, comprenant ces séquences introgressées.

L'intervalle introgressé agit comme allèle récessif unique d'un gène de résistance responsable du phénotype (le caractère de résistance est monogénique) ; la génération F1 découlant d'un  
15 croisement entre une plante résistante et une plante sensible ne manifestera donc pas le phénotype désiré de résistance au ToLCNDV, comme illustré dans l'exemple 6. Seul l'état homozygote d'une plante pour l'intervalle introgressé montrera pleinement le phénotype de résistance au ToLCNDV. Ce phénotype peut servir à identifier un descendant à l'état homozygote pour l'intervalle ou les séquences introgressé(es) revendiqué(es). Comme  
20 mentionné précédemment, le phénotype de résistance peut, dans certains cas, être également qualifié comme tolérant au ToLCNDV. L'intervalle introgressé agissant comme gène de résistance confère le phénotype d'intérêt, et n'est pas lié à des caractéristiques négatives incompatibles avec la qualité marchande des plantes ou des fruits, *entre autres*, faible valeur brix inférieure à 6 ou 7, ou couleur blanc-vert de la chair.

25 Le phénotype de résistance peut être contrôlé comme décrit dans les exemples 1 et 2 de la section expérimentale, à savoir, par infection naturelle ou inoculation mécanique.

De préférence, les séquences introgressées se trouvent sur le chromosome 11 du génome de *C. melo* subsp. *melo*, et confèrent donc une résistance et/ou tolérance au ToLCNDV, lorsqu'elles sont présentes sur les deux chromosomes homologues 11, ou sur tous les  
30 chromosomes homologues 11, si la plante a plus de deux ensembles de chromosomes, à savoir, sur tous les chromosomes 11 présents dans le génome de la plante.

Les séquences introgressées qui confèrent la résistance se situent, encore plus préférentiellement, dans la région chromosomique du chromosome 11, délimitée, d'un côté, par le SNP Melon\_sbg\_617\_42 (SEQ ID N°1), et, de l'autre, par le SNP Melon\_sbg\_16835\_17  
35 (SEQ ID N°16).

Les polymorphismes spécifiques correspondant aux SNP (polymorphisme d'un seul nucléotide simple) indiqués dans la présente description, ainsi que les séquences adjacentes de ces SNP dans le génome de *C. melo*, sont mentionnés dans la section expérimentale, tableau 4 et le

listage de séquences joint, ainsi que leur position dans la séquence du construit du génome du melon (Garcia-Mas et coll., 2012).

On notera, à cet égard, que, par définition, un SNP désigne un nucléotide isolé simple dans le génome, qui varie en fonction de l'allèle présent, alors que les nucléotides adjacents sont  
5 identiques. La position des différents SNP est identifiée clairement dans le tableau 4, en référence à celle de la séquence du construit du génome du melon et à leurs séquences adjacentes, identifiées par le numéro SEQ ID. Dans la séquence associée à un SNP spécifique dans la présente demande, par exemple, SEQ ID N°1 pour le SNP Melon\_sbg\_617\_42, un seul  
10 nucléotide de la séquence correspond réellement au polymorphisme, à savoir, le nucléotide ayant la position identifiée par le dernier numéro du nom du SNP, p. ex., le 42<sup>e</sup> nucléotide de la SEQ ID N°1 correspond à la position polymorphique SNP Melon\_sbg\_617\_42. Les séquences adjacentes sont données pour le positionnement du SNP dans le génome, mais ne font pas partie du polymorphisme en tant que tel.

L'intervalle ou les séquences introgressé(es) conférant la résistance ou la tolérance est/sont  
15 choisi(es), de préférence, dans les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* présentes dans le génome d'un plant de ToLR1, dont les graines représentatives ont été déposées auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB 42506. Elles sont choisies spécialement dans les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* présentes sur le chromosome 11 dudit NCIMB 42506. Les semences déposées comprennent,  
20 en effet, sur les deux chromosomes homologues 11, des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* H-MLCND-32, à savoir du partenaire d'introgression manifestant le phénotype d'intérêt, lesdites séquences introgressées conférant également le phénotype dans le patrimoine génétique de *C. melo* subsp. *melo*. Un échantillon de cette semence ToLR1 a été déposé par Hazera Seeds Ltd, Berurim, M.P. Shikmim 79837, Israël, conformément, et  
25 pour satisfaire aux exigences du Traité de Budapest sur la reconnaissance internationale du dépôt des micro-organismes aux fins de la procédure en matière de brevets (le « Traité de Budapest ») auprès de la National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB), (NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Royaume-Uni), le 23 décembre 2015, sous le numéro d'ordre NCIMB 42506. Les semences  
30 déposées ne proviennent pas d'une variété végétale.

Un dépôt de cette semence ToLR1 est conservée par Hazera Seeds Ltd, Berurim, M.P. Shikmim 79837, Israël.

Les séquences conférant la résistance sont présentes sur les deux chromosomes homologues 11 de l'ensemble des semences déposées ; en tant que tel, le génome de ces semences  
35 représente un réservoir de séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* dans le génome de *C. melo* subsp. *melo*, conférant une résistance au ToLCNDV selon l'invention. Une plante ou une semence de l'invention comprend dans son génome des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, à savoir de H-MLCND-32

choisies dans ce réservoir, et que l'on peut donc trouver dans celui-ci.

Alors que les semences déposées possèdent toutes un fragment introgressé au même locus, conférant le phénotype selon l'invention, ce fragment peut varier en longueur entre les semences déposées.

5 La présente invention concerne donc également une semence, une plante ou une cellule de *C. melo* subsp. *melo* ayant dans son génome des séquences de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* conférant une résistance au ToLCNDV, dans laquelle lesdites séquences introgressées, conférant la résistance sont choisies dans les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* présentes dans le génome d'une semence de ToLR1  
10 correspondant au dépôt de NCIMB 42506. Cette résistance n'est conférée que lorsque lesdites séquences sont présentes à l'état homozygote. Lesdit(e)s intervalles ou séquences introgressé(e)s peuvent faire partie de fragment d'introgression plus grands de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* dans le génome d'une plante *C. melo* subsp. *melo* de l'invention.

15 Par « intervalles ou séquences introgressé(e)s de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, à un locus donné » ou « intervalles ou séquences introgressé(e)s de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, présent(e)s / trouvé(e)s, à un locus donné », on entend que l'intervalle génomique trouvé à ce locus donné a la même séquence que l'intervalle génomique correspondant trouvé chez le donneur *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, à savoir dans le partenaire  
20 d'introgression, au même locus et a également la même séquence que l'intervalle génomique correspondant trouvé chez ToLR1 (NCIMB 42506) au même locus. En ayant la « même séquence », cela signifie que les deux séquences à comparer sont identiques à l'exception de mutations ponctuelles potentielles pouvant intervenir pendant la transmission de l'intervalle génomique à la descendance, à savoir, de préférence, au moins identique à 99 % sur une  
25 longueur de 1 kbase. On peut déduire qu'un intervalle génomique testé présente la même séquence, au sens de l'invention, que l'intervalle génomique correspondant trouvé chez le donneur *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* au même locus, si ledit intervalle génomique testé est également capable de conférer une résistance au ToLCNDV.

La présence de séquences introgressées dans le génome d'une plante, semence, ou cellule de  
30 *C. melo* subsp. *melo* peut, par exemple, être montrée par GISH (hybridation génétique in situ). La GISH est en effet une technique puissante de détection de l'introgression de chromatine d'une espèce ou sous-espèce dans une autre espèce ou sous-espèce. L'avantage de la GISH est que le processus d'introgression est visualisé au moyen d'« images du génome introgressé ». Cette technique permet également d'établir si une région particulière du génome  
35 est à l'état homozygote ou hétérozygote, grâce à l'utilisation de marqueurs cytogénétiques moléculaires co-dominants. Cette technique permet également de déterminer sur quel chromosome un gène introgressé d'intérêt est présent.

Selon un mode de réalisation préféré, les séquences introgressées conférant la résistance à

une plante ou semence de *C. melo* subsp. *melo* de l'invention et qui se trouvent également dans le génome des semences déposées, sont introgressées sur le chromosome 11 d'une plante selon l'invention, et plus précisément, dans la région chromosomique du chromosome 11 délimitée d'un côté, par le Melon\_sbg\_617\_42 (SEQ ID N°1) et, de l'autre côté, par le  
5 Melon\_sbg\_16835\_17 (SEQ ID N°16), de préférence, dans la première sous-région délimitée par Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7) et Melon\_sbg\_16835\_17, et encore plus de préférence, dans la seconde sous-région délimitée, d'un côté, par le Melon\_sbg\_33761\_74 et, de l'autre côté, par le Melon\_sbg\_22016\_36 (SEQ ID N°12).

En d'autres termes, dans le génome d'une plante, semence ou cellule de *C. melo* subsp. *melo*,  
10 de l'invention, la section de chromosome 11 dans la région et / ou les sous-régions mentionnées ci-dessus, comprend des séquences provenant de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*. Ces séquences sont responsables de la résistance au ToLCNDV, dans les patrimoines génétiques de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* et *C. melo* subsp. *melo*.

Selon un mode de réalisation préféré, les régions chromosomiques mentionnées ci-dessus, et,  
15 de préférence, la région délimitée, d'un côté, par Melon\_sbg\_33761\_74 et, de l'autre côté, par Melon\_sbg\_22016\_36, comprennent ou correspondent exclusivement à des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*. Selon ce mode de réalisation, dans une plante, une semence ou une cellule de l'invention, le fragment génomique desdites régions, et, en particulier, de la région entre les positions correspondant à Melon\_sbg\_33761\_74 et  
20 Melon\_sbg\_22016\_36, est un fragment d'introgression de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, et donc, a la même séquence que le fragment génomique délimité par les mêmes SNP dans les semences déposées.

On notera, à cet effet, que des positions spécifiques dans un chromosome peuvent en effet être  
25 définies par un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP), dans la mesure où les séquences adjacentes desdits SNP sont définies de manière à les positionner clairement sur le génome. Les présents inventeurs ont utilisé des SNP, identifiés par leurs séquences adjacentes, présentes dans les génomes des sous-espèces *melo* et *agrestis*, pour faire la distinction entre des séquences résidentes de façon endogène et celles introgressées, et pour localiser les  
30 segments introgressés de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* dans le génome de *C. melo* subsp. *melo*.

Une région chromosomique délimitée par deux SNP X et Y concerne la section du chromosome située entre les positions de ces deux SNP et les comprenant ; par conséquent, la séquence nucléotidique de cette région chromosomique commence par le nucléotide correspondant à  
35 SNP X et se termine par le nucléotide correspondant à SNP Y, à savoir que les SNP sont compris dans la région qu'ils délimitent au sens de l'invention.

Les présents inventeurs ont identifié que des séquences introgressées essentielles au

phénotype d'intérêt se trouvent dans la région chromosomique mentionnée ci-dessus, en identifiant la présence de séquences introgressées à différents loci le long desdites régions, à savoir à 16 différents loci définis par les 16 SNP suivants : Melon\_sbg\_617\_42, Melon\_sbg\_617\_84, Melon\_sbg\_20578\_63, Melon\_sbg\_20578\_82, Melon\_sbg\_55680\_17, Melon\_sbg\_60684\_74, Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78, Melon\_sbg\_14207\_58, Melon\_sbg\_22016\_27, Melon\_sbg\_22016\_30, Melon\_sbg\_22016\_36, Melon\_sbg\_11556\_13, Melon\_sbg\_24259\_45, Melon\_sbg\_16835\_5 et Melon\_sbg\_16835\_17. La présence de séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* à ces loci indique donc une résistance au phénotype ToLCNDV. Ces 16 SNP sont désignés ici comme les 16 SNP de l'invention.

Par conséquent, selon un autre mode de réalisation de l'invention, les séquences introgressées présentes dans le génome d'une plante d'une semence ou d'une cellule de l'invention se trouvent, de préférence, au moins à un ou plusieurs des 16 loci comprenant lesdits 16 SNP mentionnés ci-dessus, par exemple, à 2, 3, 4, 8, 10 ou 12 de ces 16 loci, ou à tous les loci.

De manière encore préférée, les séquences introgressées se trouvent dans la sous-région délimitée par les SNP Melon\_sbg\_33761\_74 et SNP Melon\_sbg\_16835\_17, et donc au moins à un des 10 loci correspondant aux loci comprenant l'un des 10 SNP Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78, Melon\_sbg\_14207\_58, Melon\_sbg\_22016\_27, Melon\_sbg\_22016\_30, Melon\_sbg\_22016\_36, Melon\_sbg\_11556\_13, Melon\_sbg\_24259\_45, Melon\_sbg\_16835\_5 et Melon\_sbg\_16835\_17. Ces 10 SNP sont désignés ici comme les 10 SNP préférés de l'invention. Les séquences introgressées se trouvent, de préférence, au moins à 2, 3, 4, 8 de ces 10 loci, ou à tous les loci.

De manière encore plus préférée, les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, présentes dans le génome d'une plante ou d'une semence de l'invention, se trouvent de préférence au moins à un ou plusieurs des loci suivants, situés dans la sous-région délimitée par les SNP Melon\_sbg\_33761\_74 et SNP Melon\_sbg\_22016\_36 :

- locus comprenant le SNP Melon\_sbg\_33761\_74 et / ou
- locus comprenant le SNP Melon\_sbg\_2720\_78 et / ou
- locus comprenant le SNP Melon\_sbg\_14207\_58 et / ou
- locus comprenant le SNP Melon\_sbg\_22016\_27 et / ou
- locus comprenant le SNP Melon\_sbg\_22016\_30 et / ou
- locus comprenant le SNP Melon\_sbg\_22016\_36

On notera que les trois SNP Melon\_sbg\_22016\_27 (SEQ ID N°10), SNP Melon\_sbg\_22016\_30 (SEQ ID N°11) et SNP Melon\_sbg\_22016\_36 (SEQ ID N°12) ne sont éloignés que de 3 nucléotides les uns des autres, de sorte qu'ils sont généralement transmis en bloc, comme un haplotype ; de ce fait, si des séquences introgressées se trouvent à un de ces 3 loci, elles se trouvent également aux 2 autres. Des séquences introgressées, qui confèrent le phénotype de résistance se trouvent donc à un ou plusieurs des loci suivants :

- locus comprenant le SNP Melon\_sbg\_33761\_74 et / ou
- locus comprenant le SNP Melon\_sbg\_2720\_78 et / ou
- locus comprenant le SNP Melon\_sbg\_14207\_58 et / ou
- locus comprenant les SNP Melon\_sbg\_22016\_27, Melon\_sbg\_22016\_30 et  
5 Melon\_sbg\_22016\_36.

La présence de séquences introgressées conférant le phénotype d'intérêt, dans une plante, une semence ou une cellule de l'invention, se caractérise donc par au moins un marqueur sélectionné dans le groupe consistant en SNP Melon\_sbg\_33761\_74, SNP Melon\_sbg\_2720\_78, SNP Melon\_sbg\_14207\_58, SNP Melon\_sbg\_22016\_27, SNP  
10 Melon\_sbg\_22016\_30 et SNP Melon\_sbg\_22016\_36, de préférence, par au moins 2, 3, 4 ou 5 marqueurs choisis dans ce groupe.

Lorsque les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, conférant la résistance (ou la tolérance, en fonction des conditions) se trouvent dans un locus comprenant un SNP donné, cela signifie que l'allèle de ce SNP est celui trouvé dans le partenaire  
15 d'introgression sauvage de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, H-MLCND-32, ainsi que dans ToLR1 (NCIMB 42506) résistante, déposée. Cela signifie également que la région adjacente en 5' desdits SNP, ou la région adjacente en 3' dudit SNP, ou les deux régions, sont également identiques aux séquences de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* dans cette région. Par conséquent, ce SNP donné peut faire partie de la limite en 3' ou en 5' de l'intervalle introgressé,  
20 ou peut se trouver dans l'intervalle introgressé conférant le phénotype désiré.

Les allèles des 16 SNP de l'invention correspondant aux allèles de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* conférant la résistance, sont : l'allèle T de Melon\_sbg\_617\_42, l'allèle G de Melon\_sbg\_617\_84, l'allèle A de Melon\_sbg\_20578\_63, l'allèle C de Melon\_sbg\_20578\_82, l'allèle A de Melon\_sbg\_55680\_17, l'allèle A de Melon\_sbg\_60684\_74, l'allèle T de  
25 Melon\_sbg\_33761\_74, l'allèle G de Melon\_sbg\_2720\_78, l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58, l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_27, l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_30, l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_36, l'allèle C de Melon\_sbg\_11556\_13, l'allèle C de Melon\_sbg\_24259\_45, l'allèle T de Melon\_sbg\_16835\_5, et l'allèle T de Melon\_sbg\_16835\_17. La présence des séquences introgressées d'intérêt peut être révélée par celle desdits allèles spécifiques,  
30 caractéristiques du partenaire d'introgression résistant, et différents de l'allèle du parent récurrent de *C. melo* subsp. *melo* pour ces SNP. Les allèles de ces derniers peuvent donc refléter la présence des séquences d'introgression de l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré, les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis*  
35 var. *acidulous* conférant la résistance (ou la tolérance, en fonction des conditions) se trouvent dans un locus comprenant Melon\_sbg\_14207\_58. L'allèle du SNP Melon\_sbg\_14207\_58 dans le génome d'une plante, d'une semence ou d'une cellule de l'invention est donc celui de ce SNP trouvé dans le partenaire d'introgression sauvage H-MLCND-32, ainsi que dans la semence

ToLR1 résistante déposée, à savoir, l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58. La région adjacente en 5' dudit SNP, ou la région adjacente en 3' dudit SNP, ou les deux régions, sont également identiques aux séquences de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* dans cette région. Par conséquent, ce SNP donné peut faire partie de la limite en 3' ou en 5' de l'intervalle introgressé, mais se trouve, de préférence, dans l'intervalle introgressé conférant le phénotype désiré.

Selon un mode de réalisation préféré, les séquences introgressées présentes dans le génome d'une plante, d'une semence ou d'une cellule de l'invention se trouvent à un ou deux des loci suivants :

- 10 - locus comprenant le SNP Melon\_sbg\_33761\_74 et
- locus comprenant le SNP Melon\_sbg\_2720\_78 ;

en plus, ou à la place des séquences introgressées trouvées au locus comprenant Melon\_sbg\_14207\_58 selon le mode de réalisation précédent.

Les trois SNP Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78 et Melon\_sbg\_14207\_58 sont en effet ceux qui possèdent la meilleure valeur prédictive pour le phénotype d'intérêt.

Selon un mode de réalisation préféré, les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* se trouvent dans un segment chromosomique incluant et comprenant les trois SNP Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78 et Melon\_sbg\_14207\_58, c'est-à-dire que la région délimitée par Melon\_sbg\_33761\_74 et Melon\_sbg\_14207\_58 est un fragment d'introgession de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*.

Les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* se trouvent, de préférence au locus comprenant les SNP Melon\_sbg\_22016\_27, Melon\_sbg\_22016\_30 et Melon\_sbg\_22016\_36.

En conséquence, une plante, une semence ou une cellule résistante de l'invention peut également se caractériser par l'allèle A homozygote de Melon\_sbg\_14207\_58 (SEQ ID N°9), ou l'allèle homozygote T de Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7), ou l'allèle homozygote G de Melon\_sbg\_2720\_78 (SEQ ID N°8), ou deux de ces allèles ou tous ces allèles. Elle peut de plus se caractériser par l'allèle G des SNP Melon\_sbg\_22016\_27, Melon\_sbg\_22016\_30 et Melon\_sbg\_22016\_36.

30

La présence des séquences introgressées peut être également révélée par amplification génique de séquences dans les régions délimitées par les SNP de l'invention, de préférence, la région délimitée par Melon\_sbg\_33761\_74 et Melon\_sbg\_22016\_36, ou par amplification génique de séquences à proximité des SNP définis dans la présente invention, de préférence, Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78 et Melon\_sbg\_14207\_58, et, de préférence, Melon\_sbg\_14207\_58, suivie d'une comparaison avec la séquence du fragment d'amplification respectif, obtenu en effectuant la même amplification génique sur des semences déposées auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB 42506. Les amorces pour l'amplification

génique peuvent être définies en utilisant les séquences adjacentes décrites dans la présente invention, le cas échéant, en combinaison avec l'ensemble du génome *C. melo* disponible.

De préférence, les séquences introgressées conférant le phénotype d'intérêt, à savoir, la résistance ou la tolérance, sont en déséquilibre de liaison avec l'allèle de  
5 Melon\_sbg\_14207\_58, et, encore plus préférentiellement, avec les allèles des trois SNP Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78 et Melon\_sbg\_14207\_58. Le déséquilibre de liaison est en effet utilisé pour décrire l'héritage commun de séquences génomiques dans une analyse de population croisée, en absence de liaison. La liaison décrit l'héritage commun de séquences génomiques dans une structure de population en se basant sur la fréquence de  
10 recombinaison.

Le score de déséquilibre de liaison peut être tout score positif, à savoir que l'association d'un ou de tous les SNP Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78 et Melon\_sbg\_14207\_58 avec les séquences introgressées n'est pas aléatoire.

Ainsi, dans une plante, une semence ou une cellule de l'invention, comprenant dans son  
15 génome des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, lesdites séquences introgressées se trouvent, de préférence, dans le génome à une distance génétique inférieure à 20 cM, de préférence, inférieure à 15 cM, le plus de préférence, inférieure à 10 cM, et encore plus de préférence, inférieure à 5 cM du locus correspondant au SNP Melon\_sbg\_14207\_58.

20

Selon un mode de réalisation, une semence, une plante ou une cellule de l'invention se caractérise par la présence de l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58 sur le chromosome 11, en combinaison avec l'absence d'allèle C dudit SNP. La présence de l'allèle A dudit SNP confirme en effet celle de séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* au locus  
25 de Melon\_sbg\_14207\_58 ; en outre, l'absence d'allèle C confirme que les séquences introgressées sont présentes à l'état homozygote, à savoir sur les deux homologues du chromosome 11.

Selon un autre mode de réalisation, une semence, une plante ou une cellule de l'invention se caractérise par la présence de l'allèle G du SNP Melon\_sbg\_2720\_78, en combinaison avec  
30 l'absence de l'allèle A dudit SNP. La présence de l'allèle G de ce SNP confirme, en effet, celle de séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* au locus de SNP Melon\_sbg\_2720\_78 ; en outre, l'absence de l'allèle A confirme la présence à l'état homozygote des séquences introgressées.

Toujours selon un autre mode de réalisation, une semence, une plante ou une cellule de  
35 l'invention se caractérise par la présence de l'allèle T du SNP Melon\_sbg\_33761\_74, en combinaison avec l'absence d'allèle C dudit SNP.

Dans un mode de réalisation préféré, l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58, l'allèle G du SNP Melon\_sbg\_2720\_78 et l'allèle T de Melon\_sbg\_33761\_74 sont présents simultanément, dans

un génome d'une plante d'une semence ou d'une cellule de l'invention, et les autres allèles de ces SNP sont absents, à savoir, respectivement, les allèles C, A et C.

Toujours dans un autre mode de réalisation, une plante, une cellule ou une semence de l'invention se caractérise par :

- 5 - la présence de l'allèle T de Melon\_sbg\_33761\_74 combinée à l'absence de l'allèle C pour ce SNP ; et/ou
- la présence de l'allèle G de Melon\_sbg\_2720\_78 combinée à l'absence de l'allèle A pour ledit SNP ; et/ou
- la présence de l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58 combinée à l'absence de l'allèle C pour ledit SNP ; et/ou
- 10 - la présence de l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_27 combinée à l'absence de l'allèle C pour ledit SNP ; et/ou
- la présence de l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_30 combinée à l'absence de l'allèle A pour ledit SNP ; et/ou
- 15 - la présence de l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_36 combinée à l'absence de l'allèle A pour ledit SNP.

Dans un autre mode de réalisation, dans le génome d'une plante, d'une semence ou d'une cellule de *C. melo* subsp. *Melo* de l'invention, les séquences introgressées se trouvent de préférence strictement dans un intervalle chromosomique du chromosome 11, limites exclues, dans lequel les dites limites correspondent à la position de Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7), d'un côté, et à la position de Melon\_sbg\_22016\_36 (SEQ ID N°12) de l'autre côté, à savoir que l'allèle de Melon\_sbg\_33761\_74 et l'allèle de Melon\_sbg\_22016\_36 sont représentatifs de séquences de *C. melo* subsp. *melo*, c'est à dire de séquences non introgressées.

25 De préférence cependant, les allèles de ces SNP sont représentatifs de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*.

Selon un mode préféré de la présente invention, l'intervalle ou les séquences introgressé(es) de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* présent(es) dans le génome d'une semence ou d'une plante de l'invention, et conférant la résistance au ToLCNDV, ont une longueur d'au moins 5 kilobases, et de préférence une longueur d'au moins 8, 10 ou 15 kb. Les intervalles ou les séquences introgressé(e)s *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* ne sont cependant pas trop longs pour éviter l'introggression de caractéristiques non commerciales associées au génotype de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*. Il est donc préféré selon l'invention que les séquences introgressées mentionnées ci-dessus aient une longueur inférieure à 25 cM, de préférence, inférieure à 20 cM ou inférieure à 15 cM. Selon des modes de réalisation plus préférés, les séquences introgressées ont une longueur inférieure à 10 cM, voire inférieure à 5 cM, et, encore plus préférentiellement, inférieure à 5 cM afin d'éviter ou de limiter le « linkage drag ».

Les séquences introgressées sont réduites pour contenir le moins possible de séquences non liées au phénotype désiré.

La semence ou la plante selon cet aspect de l'invention est de préférence très résistante au ToLCNDV, et reste *inter alia* exempte de symptômes, à savoir de mosaïque jaune de 5 flétrissement et rabougrissement, jusqu'à la fin de la saison, lorsqu'elle croît dans des conditions d'infection.

La résistance et / ou la tolérance, selon l'invention est principalement une résistance et / ou tolérance à l'infection par le ToLCNDV, mais selon un mode de réalisation préféré, les séquences introgressées confèrent une résistance à un ou plusieurs géminivirus additionnel(s), 10 en particulier une résistance à un ou plusieurs bégomovirus.

Comme détaillé ci-dessus, l'invention concerne des plantes de *C. melo* subsp. *melo*, résistantes à l'infection par le ToLCNDV, ainsi que les semences à l'origine de ces plantes.

Une plante de *C. melo* subsp. *melo* selon l'invention peut être une plante, une lignée ou une 15 variété commerciale, de préférence cultivée pour ses fruits. Cette plante ou lignée commerciale, lorsqu'elle est cultivée dans des conditions appropriées, donne naissance à des fruits commercialisables après une pollinisation adéquate.

Les melons commercialisables se caractérisent entre autres par une chair de couleur orangée avec d'éventuelles taches de couleur crème, de préférence couleur orangée, et / ou une forme 20 de fruit ovale ou ronde, et /ou une valeur brix d'au moins 9, de préférence d'au moins 10. Un melon commercialisable se caractérise de préférence par la présence de l'ensemble des caractéristiques susmentionnées, et, de préférence, par une forme de fruits ronde, une chair de couleur orangée et une valeur brix d'au moins 9.

25 Une semence ou une plante préférée de l'invention est donc capable de porter des melons ayant une chair de couleur orangée, tel que défini dans a section expérimentale. Ces fruits possèdent de préférence également une forme ronde ou ovale-ronde. Ils possèdent, de préférence, une valeur brix d'au moins 9, et, de préférence, d'au moins 10 ou 11. L'invention concerne également des semences ou des plantes capables de porter des fruits ayant une 30 valeur brix supérieure à 9.

Une plante ou semence selon l'invention peut être issue d'une plante cultivée à partir des semences de ToLR1, déposées auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB 42506. Les plantes cultivées à partir des semences déposées résistent, en effet, à l'état homozygote 35 au ToLCNDV, et portent donc dans leur génome les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, conférant une résistance au ToLCNDV, sur les deux homologues du chromosome 11. Elles peuvent être utilisées pour transférer ces séquences dans un autre patrimoine génétique par croisement et auto-fécondation et / ou rétrocroisement.

Les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, qui confèrent une résistance ou une tolérance au ToLCNDV, selon la présente invention, sont présentes à l'état homozygote dans le génome d'une plante ou d'une semence résistante. En conséquence, une telle plante montre, sur deux homologues du chromosome 11, des séquences introgressées de  
5 *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, capable de conférer une résistance au ToLCNDV, lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote. Il faut se rappeler que cela n'implique donc pas nécessairement que les fragments d'introgression de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* sur les deux homologues du chromosome 11 sont identiques. En effet, l'un d'eux peut ne comprendre que des séquences introgressées nécessaires et suffisantes pour conférer une  
10 résistance, alors que l'autre homologue comprend un fragment d'introgression plus grand, comprenant lesdites séquences en plus d'autres séquences de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, non liées à la résistance.

L'invention concerne également les semences déposées ToLR1 (NCIMB 42506) et les plantes cultivées à partir d'une de ces semences. Ces semences contiennent les séquences  
15 introgressées à l'état homozygote, qui confèrent le phénotype d'intérêt ; elles sont cependant distinctes en ce qui concernent d'autres caractères phénotypiques, de sorte qu'elles ne forment pas une variété de plantes.

L'invention concerne également des plantes ou semences résistantes, telles que définies précédemment, à savoir qu'elles contiennent les séquences introgressées d'intérêt sous forme  
20 homozygote, susceptibles d'être obtenues en transférant les séquences introgressées d'une plante *C. melo* résistante, dont les semences représentatives ont été déposées auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB-42506, dans un autre patrimoine génétique de *C. melo* subsp. *melo*, par exemple, en croisant ladite plante résistante avec une seconde plante parente de melon.

25

Dans un deuxième aspect, l'invention concerne également un second type de plantes, de semences ou de cellules, à savoir des plantes, semences ou de cellules de *C. melo* subsp. *melo*, qui portent dans leur génome les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* conférant une résistance au ToLCNDV lorsqu'elles sont présentes à l'état  
30 homozygote, mais qui ne portent pas ces séquences sur les deux homologues du chromosome 11, c'est à dire qu'elles sont hétérozygotes pour les séquences introgressées conférant le phénotype, à savoir hétérozygotes pour le locus de résistance ou le gène de résistance. Les séquences introgressées d'intérêt sont celles définies précédemment, dont une copie est présente dans le génome des semences déposées sous le numéro d'ordre NCIMB 42506.

35 En raison du fait que les séquences introgressées sont présentes à l'état hétérozygote dans le second type de plantes, semences ou cellules de l'invention, ces plantes ne montrent pas le phénotype d'intérêt, à savoir qu'elles ne résistent pas au ToLCNDV, caractère les excluant en outre des auto-pollinisations, et que le phénotype n'est pas exprimé lorsque l'on les croise avec

d'autres plantes sensibles.

Selon l'invention, lesdites plantes hétérozygotes peuvent être obtenue en croisant une plante homozygote mentionnée ci-dessus avec une seconde plante de l'espèce *C. melo* subsp. *melo*, la seconde plante étant sensible au ToLCNDV, et ne portant pas les séquences introgressées de l'invention. Par exemple, une plante selon ce mode de réalisation de l'invention peut être obtenue en croisant une plante cultivée à partir d'une semence de ToLR1, déposée auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB 42506, avec une lignée parentale de *C. melo* subsp. *melo* sensible au ToLCNDV ne portant pas de séquences introgressées *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*.

10 Selon une autre solution, lesdites plantes hétérozygotes peuvent également être obtenues en croisant une plante résistante, à l'état homozygote, selon le premier aspect de l'invention, avec une plante de *C. melo* subsp. *melo* moins résistante à l'infection par le ToLCNDV que les plantes de l'invention, ou qui résiste au ToLCNDV grâce à un autre type de résistance, non introgressé à partir de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*.

15 Le second type de plante selon l'invention peut, bien entendu, être obtenu par d'autres procédés connus du lecteur averti.

En auto-pollinisant des plantes diploïdes du 2<sup>d</sup> aspect de l'invention, la descendance de cette auto-pollinisation correspondra également à 50% de ce type, à savoir qu'elle portera les séquences de résistance sans montrer le phénotype d'intérêt, résistera à 25% à l'état homozygote, au ToLCNDV, tel que défini dans le premier aspect de l'invention, et ne résistera pas dans une proportion de 25% et ne portera pas non plus les séquences de résistance de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*. Les rapports peuvent être différents si la plante ou la semence selon le 2<sup>d</sup> aspect n'est pas diploïde ou si le second parent résiste au ToLCNDV, en raison d'une autre source génétique de résistance

25 L'invention concerne donc toute plante hybride de *C. melo* subsp. *melo* susceptible d'être obtenue par croisement d'une plante résistant au ToLCNDV, tel que décrite dans la présente description selon le 1<sup>er</sup> aspect, avec une plante de *C. melo* subsp. *melo*, de préférence, sensible. La plante hybride peut être obtenue par croisement d'une plante résistant au ToLCNDV, selon l'invention, comme parent femelle, et une seconde plante, comme parent mâle, ou, selon une autre alternative, par croisement d'une plante résistant au ToLCNDV, selon l'invention, comme parent mâle, et une seconde plante, comme parent femelle.

La présence des séquences introgressées selon l'invention peut être révélée par le séquençage des régions chromosomiques de l'invention, à savoir, la région délimitée par le SNP Melon\_sbg\_617\_42 et le SNP Melon\_sbg\_16835\_17, plus de préférence, par le séquençage de la région délimitée par Melon\_sbg\_33761\_74 et Melon\_sbg\_16835\_17, et, encore plus de préférence, par le séquençage de la région délimitée par Melon\_sbg\_33761\_74 et Melon\_sbg\_22016\_36.

Selon une autre alternative, la présence des séquences introgressées peut être révélée en

identifiant des allèles de SNP spécifiques, représentatifs des séquences introgressées. La présence des séquences introgressées peut donc être contrôlée en vérifiant la présence d'un ou de plusieurs des allèles suivants : l'allèle T de Melon\_sbg\_617\_42, l'allèle G de Melon\_sbg\_617\_84, l'allèle A de Melon\_sbg\_20578\_63, l'allèle C de Melon\_sbg\_20578\_82, 5 l'allèle A de Melon\_sbg\_55680\_17, l'allèle A de Melon\_sbg\_60684\_74, l'allèle T de Melon\_sbg\_33761\_74, l'allèle G de Melon\_sbg\_2720\_78, l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58, l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_27, l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_30, l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_36, l'allèle C de Melon\_sbg\_11556\_13, l'allèle C de Melon\_sbg\_24259\_45, l'allèle T de Melon\_sbg\_16835\_5, et l'allèle T de Melon\_sbg\_16835\_17.

10 De préférence, la présence des séquences introgressées est révélée par celle, pour un ou plusieurs des 10 SNP préférés de l'invention, de l'allèle correspondant lié à la résistance, comme défini dans le tableau 4, et, de préférence, par un ou plusieurs de l'allèle T de Melon\_sbg\_33761\_74, l'allèle G de Melon\_sbg\_2720\_78, l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58, l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_27, l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_30 et l'allèle G de 15 Melon\_sbg\_22016\_36.

La présence des séquences introgressées est de préférence confirmée en vérifiant la présence d'au moins 2, 3 ou 5 des 16 SNP de l'invention, de préférence, au moins 2, 3, 4 ou 5 des 10 SNP préférés ou des 6 SNP Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78, Melon\_sbg\_14207\_58, Melon\_sbg\_22016\_27, Melon\_sbg\_22016\_30 et 20 Melon\_sbg\_22016\_36.

Selon un mode de réalisation préféré, la présence de séquences introgressées d'intérêt est vérifiée en déterminant la présence de l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58, soit seul soit, de préférence, avec l'allèle T de Melon\_sbg\_33761\_74 et/ou avec l'allèle G du SNP Melon\_sbg\_2720\_78.

25 L'état hétérozygote du génome d'une plante, d'une semence ou d'une partie de plante pour les séquences introgressées d'intérêt peut être mis en évidence par la présence simultanée de deux allèles pour le(s) SNP choisi(s), par exemple, par la présence des allèles A et C du SNP Melon\_sbg\_14207\_58. Pour tous les SNP de l'invention, les allèles liés à la résistance et la sensibilité sont indiqués dans le tableau 4.

30 La présence des séquences introgressées peut également être révélée par amplification génique de séquences à proximité des SNP définis dans la présente invention, en particulier, Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78 et Melon\_sbg\_14207\_58, et par comparaison avec la séquence du fragment d'amplification respectif, obtenu en procédant à l'amplification sur des semences déposées auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB 42506, 35 comme déjà mentionné pour le 1<sup>er</sup> aspect.

L'invention concerne également toute plante susceptible d'être obtenue à partir de semences ou de plants de l'invention, comme décrits ci-dessus, ainsi que des parties de plantes de cette

plante, et, plus de préférence, explant, scion, bouture, semence, fruit, racine, porte-greffe, pollen, ovule, embryon, silique, protoplaste, feuille, anthère, tige, pétiole, et toutes autres parties de plantes, dans lesquelles ladite/ledit plante, explant, scion, bouture, semence, fruit, racine, porte-greffe, pollen, ovule, embryon, silique, protoplaste, feuille, anthère, tige, pétiole, et/ou

5 partie de plante est obtenu(e) à partir d'une semence ou d'un plant selon le premier mode de réalisation de l'invention, à savoir, portant les séquences introgressées d'intérêt, à l'état homozygote, dans leur génome ou à partir d'une semence ou d'une plante selon le second mode de réalisation de l'invention, à savoir portant les séquences introgressées d'intérêt à l'état hétérozygote dans leur génome Ces parties de plantes, *inter alia* explant, scion, bouture,

10 semence, fruit, racine, porte-greffe, pollen, ovule, embryon, silique, protoplaste, feuille, anthère, tige, ou pétiole, comprennent dans leur génome les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* conférant la résistance au ToLCNDV lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote. Les séquences introgressées mentionnées dans cet aspect de l'invention sont celles définies ci-dessus dans le contexte des plantes de l'invention. Les différentes

15 caractéristiques des séquences introgressées définies en relation avec le premier aspect de l'invention s'appliquent *mutatis mutandis* à cet aspect de l'invention. Les séquences introgressées sont donc de préférence choisies dans celles présentes dans le génome d'une plante correspondant au matériel déposé ToLR1 (numéro d'ordre NCIMB 42506). Elles se caractérisent avantageusement par la présence de l'allèle A pour Melon\_sbg\_14207\_58.

20 L'invention concerne également des cellules de plantes *C. melo* subsp. *melo*, de sorte que ces cellules comprennent des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* conférant le phénotype d'intérêt, à savoir la résistance et / ou tolérance au ToLCNDV, lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote. Les séquences introgressées sont celles déjà définies dans le cadre de la présente invention, et présentent les même caractéristiques et

25 modes de réalisation préférés déjà décrits pour les plantes et semences selon les modes de réalisation précédents de l'invention. La présence de ces séquences introgressées peut être révélée par les techniques décrites ci-dessus et bien connues du lecteur averti. On peut *inter alia* déterminer si les séquences introgressées sont présentes à l'état homozygote ou hétérozygote dans le génome d'une telle cellule de l'invention. Elles se caractérisent

30 avantageusement par la présence de l'allèle A pour le SNP Melon\_sbg\_14207\_58.

Les cellules selon l'invention peuvent être d'un type quelconque de cellule de *C. melo* subsp. *melo*, *inter alia*, une cellule capable de régénérer une plante entière de *C. melo* subsp. *melo*, portant des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* liées au phénotype d'intérêt.

35 La présente invention concerne également une culture tissulaire de cellules régénérables de la plante telle que définie ci-dessus selon la présente invention ; de préférence, les cellules régénérables dérivent d'embryons, de protoplastes, de cellules méristématiques, de cals, de pollen, de feuilles, d'anthères, de tiges, de pétioles, de racines, d'extrémités de racines, de

fruits, de semences, de fleurs, de cotylédons, et/ou d'hypocotyles, et contiennent, dans leur génome, des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* sur le chromosome 11 conférant une résistance et / ou tolérance au ToLCNDV, uniquement lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote.

- 5 La culture tissulaire sera de préférence capable de régénérer des plantes ayant les caractéristiques physiologiques et morphologiques de la plante de melon précédente, et de régénérer des plantes ayant sensiblement le même génotype que cette dernière. La présente invention fournit également des plantes de melon régénérées par les cultures tissulaires de l'invention.
- 10 L'invention fournit également un protoplaste de la plante définie ci-dessus, ou à partir de la culture tissulaire définie ci-dessus, ledit protoplaste contenant les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, conférant une résistance au ToLCNDV, lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote.
- 15 Selon un quatrième aspect, la présente invention concerne également l'utilisation d'une plante de melon tel que détaillé selon le premier aspect de l'invention, à savoir, résistant, ou tolérant, en fonction des conditions d'infection, au ToLCNDV, comme partenaire de reproduction dans un programme de sélection pour obtenir des plantes de *C. melo* subsp. *melo* résistant et / ou tolérant au ToLCNDV. En effet, selon le premier aspect, cette plante présente à l'état
- 20 homozygote dans son génome des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, qui confèrent le phénotype d'intérêt, à savoir, la résistance et/ou tolérance. Le croisement de cette plante avec des plantes sensibles ou moins résistantes, portant un autre type de résistance au ToLCNDV, permet donc de transférer ces séquences, conférant le phénotype désiré à la descendance, ledit phénotype ayant un caractère monogénique. Une
- 25 plante selon l'invention peut ainsi servir de partenaire de reproduction pour introgresser des séquences conférant le phénotype désiré dans une plante ou un germoplasme de *C. melo* subsp. *melo*. Bien qu'une plante ou une semence selon le second aspect de l'invention, à savoir, portant les séquences introgressées d'intérêt à l'état hétérozygote, puisse également être utilisée comme partenaire de reproduction, tel que détaillé ci-dessus, la ségrégation du
- 30 phénotype peut rendre le programme de sélection plus complexe.

Les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* seront avantageusement introduites dans des variétés contenant d'autres caractères génétiques souhaitables, tels que résistance à des maladies, maturation précoce du fruit, tolérance à la

35 sécheresse, forme du fruit, et similaires.

L'invention concerne également la même utilisation avec des plantes ou semence de ToLR1, déposées auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB 42506. Lesdites plantes sont également appropriées comme partenaires d'introgression dans un programme de sélection,

destiné à conférer le phénotype désiré à la plante ou au germoplasme de *C. melo* subsp. *melo*. Dans ce programme, la sélection de la descendance affichant le phénotype désiré, ou portant des séquences liées à celui-ci, peut avantageusement être réalisée sur la base des allèles des marqueurs SNP, en particulier, les marqueurs SNP de l'invention. La descendance est de  
5 préférence sélectionnée lorsque l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58, l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_2720\_78 ou l'allèle T de Melon\_sbg\_33761\_74 sur le chromosome 11, est présent. Selon une autre solution, la sélection peut être effectuée sur la base de la présence simultanée de ces 3 allèles, ou d'une combinaison de 2 de ces allèles, ladite combinaison comprenant, de préférence, l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58.

10 De manière alternative, comme détaillé ci-dessus, les autres SNP de l'invention peuvent également servir pour sélectionner des plantes ou une semence ayant le phénotype désiré ou portant une séquence d'introggression conférant ledit phénotype, lorsqu'elle est présente à l'état homozygote. Selon un mode de réalisation préféré, la sélection peut avantageusement être réalisée avec la présence simultanée d'au moins 4 ou au moins 5 des allèles SNP suivants :  
15 allèle T de Melon\_sbg\_33761\_74, allèle G de Melon\_sbg\_2720\_78, allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58, allèle G de Melon\_sbg\_22016\_27, allèle G de Melon\_sbg\_22016\_30 et allèle G de Melon\_sbg\_22016\_36. La présence de ces allèles confirme, en effet, la présence de séquences introgressées aux loci définis par lesdits SNP ; en outre, suite à une mutation ponctuelle ou une recombinaison, il est concevable qu'au moins 1 ou 2 de ces 6 allèles soi(en)t  
20 perdu(s), le reste du fragment d'introggression conférant cependant toujours le phénotype d'intérêt, lorsqu'il est présent à l'état homozygote.

La sélection de la descendance ayant le phénotype désiré peut être également effectuée dans des conditions d'infection par le ToLCNDV, comme décrit *inter alia* dans l'exemple 1 ou 2.

Selon un mode de réalisation préféré, le phénotype est testé par inoculation mécanique de  
25 ToLCNDV, comme illustré dans l'exemple 2, à savoir une inoculation par frottis de cotylédons avec une solution comprenant des feuilles infectées broyées. Cet essai d'inoculation mécanique est particulièrement approprié dans le programme de reproduction, car il est plus rapide et facile à réaliser qu'en procédant par infection naturelle.

30 Une plante selon l'invention, ou cultivée à partir d'une semence déposée sous le numéro d'ordre NCIMB 42506 est donc particulièrement utile dans une sélection assistée par marqueur pour obtenir des lignées et des variétés de melon du commerce résistant ou tolérant à l'infection par le ToLCNDV.

L'invention concerne également l'utilisation desdites plantes dans un programme destiné à  
35 identifier, séquencer et / ou cloner les gènes conférant le phénotype désiré, à savoir la résistance au ToLCNDV.

Tout mode de réalisation spécifique décrit pour les 1<sup>er</sup>, 2<sup>d</sup> et 3<sup>e</sup> aspects de l'invention s'applique également à cet aspect de l'invention, en particulier, pour ce qui est des caractères des

séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* conférant la résistance, lorsqu'elles sont à l'état homozygote.

Selon un cinquième aspect, l'invention concerne également des méthodes ou des procédés de  
5 production de plantes de *C. melo* subsp. *melo* ayant le phénotype désiré, en particulier, des plantes commerciales.

La présente invention concerne également en effet le transfert des séquences introgressées conférant la résistance et / ou tolérance à d'autres variétés de melons ou d'autres espèces, et permettant de produire de nouveaux types et variétés de melons résistant ou tolérant au  
10 ToLCNDV.

Une méthode ou un procédé de production d'une plante présentant ces caractéristiques peut inclure les étapes suivantes :

- a) Croisement d'une plante correspondant aux semences déposées (NCIMB 42506), ou à sa descendance portant les séquences conférant la résistance au virus ToLCNDV, et  
15 d'une plante *C. melo* subsp. *melo*, dans laquelle le phénotype désiré doit être importé ou amélioré ; cette plante de *C. melo* subsp. *melo* est de préférence sensible ou moins résistante au ToLCNDV ;
- b) Sélection d'une plante dans la descendance obtenue ainsi, portant des séquences conférant une résistance au ToLCNDV uniquement lorsqu'elles sont présentes à l'état  
20 homozygote ;
- c) Auto-pollinisation, une ou plusieurs fois, de la plante obtenue à l'étape b) et sélection d'une plante résistante dans la descendance ainsi obtenue ;

dans laquelle ou lequel des marqueurs SNP peuvent être utilisés aux étapes b) et / ou c), pour sélectionner des plantes portant des séquences conférant une résistance au ToLCNDV,  
25 uniquement lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote, et / ou sélectionner des plantes résistantes au ToLCNDV. Les marqueurs SNP sont de préférence un ou plusieurs des 16 marqueurs SNP de l'invention, et, de préférence, un ou plusieurs des 10 marqueurs SNP préférés, encore plus préférentiellement, un ou plusieurs de Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78, Melon\_sbg\_14207\_58, Melon\_sbg\_22016\_27, Melon\_sbg\_22016\_30 et  
30 Melon\_sbg\_22016\_36. Selon un mode de réalisation préféré, la sélection est au moins partiellement réalisée sur la base de l'allèle du SNP Melon\_sbg\_14207\_58, avec ou sans utiliser Melon\_sbg\_33761\_74 et Melon\_sbg\_2720\_78. La sélection est encore plus préférentiellement réalisée en détectant les allèles de ces 3 marqueurs SNP. Selon une autre solution, la sélection peut être effectuée sur la détection de l'allèle d'au moins 2 SNP choisis parmi les 10 SNP  
35 préférés de l'invention, ou les 6 SNP Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78, Melon\_sbg\_14207\_58, Melon\_sbg\_22016\_27, Melon\_sbg\_22016\_30 et Melon\_sbg\_22016\_36.

De préférence, la sélection est effectuée sur au moins 3 SNP, de préférence, sur au moins 4, 5

ou 6, l'un d'entre eux étant Melon\_sbg\_14207\_58. La sélection peut être également réalisée sur la détection des allèles de tous ces SNP.

Selon un mode de réalisation préféré, la sélection est réalisée sur la base des allèles des 3 SNP Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78 et Melon\_sbg\_14207\_58.

5

Afin d'identifier les plantes portant les séquences introgressées à l'état homozygote, responsables de la résistance au ToLCNDV, la présence de l'allèle lié à la résistance doit être détectée en combinaison avec l'absence de l'allèle lié au parent récurrent.

Pour identifier les plantes portant les séquences introgressées à l'état hétérozygote, la seule  
10 présence de l'allèle lié à la résistance doit être détectée.

De préférence, la plante de *C. melo* subsp. *melo* de l'étape a) est une lignée élite, utilisée pour introduire des caractères désirés d'un point de vue commercial ou des caractères horticoles désirés.

Une méthode ou un procédé tel que défini ci-dessus peut avantageusement comprendre des  
15 étapes de rétrocroisement, de préférence, après l'étape c), de manière à obtenir des plantes ayant les caractéristiques de plantes de *C. melo* subsp. *melo*. En conséquence, une méthode ou un procédé de production d'une plante présentant ces caractéristiques peut également inclure les étapes suivantes :

- d) Rétrocroisement de la plante résistante sélectionnée à l'étape c) avec une plante de *C. melo* subsp. *melo* ;  
20
- e) Sélection d'une plante dans la descendance, portant des séquences conférant une résistance au ToLCNDV uniquement lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote ;
- f) Auto-pollinisation de la plante obtenue à l'étape e) ou croisement de plantes distinctes obtenues à l'étape e), et
- 25 g) Sélection d'une plante résistant au ToLCNDV.

La plante utilisée à l'étape a), à savoir, celle correspondant aux semences déposées, peut être une plante cultivée à partir des semences déposées, ou sa descendance, portant les séquences conférant la résistance au ToLCNDV ; selon une autre solution, cela peut être toute plante selon le 1<sup>er</sup> aspect de l'invention, à savoir, résistant à l'état homozygote au ToLCNDV.

30 De manière alternative, la méthode ou le procédé peut comprendre les étapes suivantes :

- a1) Croisement d'une plante correspondant aux semences déposées (NCIMB 42506), ou sa descendance portant les séquences conférant la résistance au ToLCNDV, et d'une plante *C. melo* subsp. *melo*, dans laquelle le phénotype désiré doit être importé ou amélioré, pour générer ainsi la population F1 ;
- 35 a2) Avancement de la population F1 pour créer la population F2 ;
- b) Sélection des individus résistants ainsi obtenus ;
- c) Facultativement, auto-pollinisation, une ou plusieurs fois, de la plante résistante obtenue à l'étape b) et sélection d'une plante résistante dans la descendance ainsi obtenue ;

- d) Facultativement, rétrocroisement de la plante résistante sélectionnée à l'étape b) ou c) avec une plante de *C. melo* subsp. *melo* ;
- e) Sélection dans la descendance d'une plante portant des séquences liées au phénotype désiré,
- 5 f) Auto-pollinisation de la plante obtenue à l'étape e) ou croisement de plantes distinctes obtenues à l'étape e), une ou plusieurs fois, et
- g) sélection d'une plante résistant au ToLCNDV.

La plante de *C. melo* subsp. *melo* des étapes a) ou a1) et d) peut être toute plante de *C. melo* subsp. *melo*, mais, de préférence, une plante sensible ou moins résistante que les plantes de  
10 l'invention.

La plante sélectionnée à l'étape b), c) ou g) des méthodes précédentes peut être une plante du commerce, en particulier, une plante ayant des fruits de forme ronde ou ronde-ovale, une chair de couleur orangée, avec d'éventuels taches de couleur crème, et/ou une valeur brix d'au moins 9, à pleine maturité, dans les conditions de culture normale.

- 15 Les étapes d), e) et / ou f) peuvent être répétées deux ou trois fois ou plus, pas nécessairement avec la même plante de *C. melo* subsp. *melo*. Ladite plante de *C. melo* subsp. *melo* est, de préférence, une lignée de reproduction. Cette plante est, de préférence, une lignée élite, utilisée pour introduire des caractères désirés commercialement ou des caractères horticoles désirés. Les étapes d'auto-pollinisation/croisement et de rétrocroisement peuvent être réalisées dans un  
20 ordre quelconque, et peuvent être intercalées, par exemple, un rétrocroisement peut être effectué avant et après un ou plusieurs auto-pollinisations/croisements, et des auto-pollinisations/croisements peuvent être envisagés avant et après un ou plusieurs rétrocroisements.

En outre, les méthodes de l'invention sont avantageusement réalisées en utilisant des  
25 marqueurs SNP pour une ou plusieurs des étapes de sélection, afin de sélectionner des plantes portant les séquences introgressées liées à la résistance et/ou la tolérance au ToLCNDV, ou afin de sélectionner des plantes ayant le phénotype d'intérêt.

Les marqueurs SNP sont, de préférence, un ou plusieurs des 10 SNP préférés, de préférence, Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78, Melon\_sbg\_14207\_58, Melon\_sbg\_22016\_27,  
30 Melon\_sbg\_22016\_30 et Melon\_sbg\_22016\_36, et encore plus préférentiellement, Melon\_sbg\_14207\_58. Selon un mode de réalisation préféré, la sélection est au moins partiellement réalisée sur la base de l'allèle de Melon\_sbg\_14207\_58. Ces modes de réalisation préférés ont déjà été détaillés dans le contexte de la présente invention, et sont identiques pour cet aspect.

- 35 Afin d'identifier des plantes portant les séquences introgressées à l'état homozygote, responsables de la résistance au ToLCNDV, la présence de l'allèle lié à la résistance, pour les SNP de l'invention, doit être détectée en combinaison avec l'absence de l'allèle lié au parent sensible récurrent.

De préférence, la sélection d'une plante résistante est effectuée par la détection de :

- la présence de l'allèle T de SNP Melon\_sbg\_33761\_74 combinée à l'absence de l'allèle C pour ledit SNP ; et/ou
- 5 - la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_2720\_78 combinée à l'absence de l'allèle A pour ledit SNP ; et/ou
- la présence de l'allèle A de SNP Melon\_sbg\_14207\_58 combinée à l'absence de l'allèle C pour ledit SNP ; et/ou
- la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_27 combinée à l'absence de l'allèle C pour ledit SNP ; et/ou
- 10 - la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_30 combinée à l'absence de l'allèle A pour ledit SNP ; et/ou
- la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_36 combinée à l'absence de l'allèle A pour ledit SNP.

La sélection de la descendance, ayant le phénotype désiré, peut être également effectuée dans  
15 des conditions d'infection par le ToLCNDV, comme décrit *inter alia* dans l'exemple 1 de l'inoculation mécanique, tel que décrit dans l'exemple 2.

La méthode utilisée pour la détection des allèles peut se baser sur toute technique permettant de faire la distinction entre deux allèles différents d'un SNP; sur un locus de chromosome spécifique.

20 La présente invention concerne également les schémas de sélection impliquant, comme première étape, le croisement d'une plante cultivée à partir d'une des semences déposées (NCIMB 42506).

La présente invention concerne également une plante obtenue ou pouvant être obtenue par  
25 une des méthodes décrites ci-dessus. Cette plante est, en effet, une plante de *C. melo* subsp. *melo* ayant le phénotype désiré selon le premier aspect de l'invention, à savoir résistant et / ou tolérant au ToLCNDV.

L'invention fournit également une méthode de production d'une semence hybride de *C. melo*  
30 subsp. *melo* comprenant le croisement d'un premier cultivar de plante avec un second cultivar de plante, et la récolte de la semence hybride résultante de *C. melo* subsp. *melo*, dans laquelle les deux parents sont des cultivars contenant les séquences introgressées dans l'état homozygote. Les semences hybrides, la plante et des parties de celle-ci, produites par cette méthode, font également partie de l'invention.

35 L'invention concerne, en outre, une méthode pour détecter et/ou sélectionner des plantes de *C. melo* subsp. *melo* ayant des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, conférant une résistance et / une tolérance au ToLCNDV, lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote, sur la base de la détection des allèles d'au moins un SNP choisi parmi les 10 SNP

préférés de l'invention sur le chromosome 11, et, plus préférentiellement, les 6 SNP Melon\_sbg\_33761\_74, Melon\_sbg\_2720\_78, Melon\_sbg\_14207\_58, Melon\_sbg\_22016\_27, Melon\_sbg\_22016\_30 et Melon\_sbg\_22016\_36. La méthode peut être réalisée sur des plantes de *C. melo* subsp. *melo* résistant au ToLCNDV ; la méthode peut donc être utilisée pour

5 confirmer que ces plantes comprennent, dans leur génome, les séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, selon la présente invention, et ont donc été obtenues à partir de cette dernière.

De préférence, les plantes portant les séquences introgressées sont sélectionnées si, au moins un des marqueurs suivants, et, de préférence, au moins 2, 3, 4, 5 ou tous parmi l'allèle T de

10 Melon\_sbg\_33761\_74, l'allèle G de Melon\_sbg\_2720\_78, l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58, l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_27, l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_30 et l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_36, est/sont détecté(s), dans un échantillon de matériel génétique de la plante à sélectionner. Plus préférentiellement, une plante est sélectionnée si, au moins un, deux ou tous les allèles suivants est/sont détecté(s) : allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58, allèle G de

15 Melon\_sbg\_2720\_78 et allèle T de Melon\_sbg\_33761\_74.

Selon un mode de réalisation préféré, l'allèle d'intérêt détecté est présent à l'état homozygote dans la plante sélectionnée, à savoir, qu'aucun autre allèle dudit SNP n'est présent. Dans ce cas, on peut conclure que la plante porte les séquences introgressées et résiste au ToLCNDV. Des méthodes de détection préférées sont détaillées ci-dessus, et applicables à cet aspect de

20 l'invention.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, la sélection est réalisée si l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58 est présent. La sélection de plantes présentant le phénotype de résistance et / ou de tolérance au ToLCNDV, est de préférence réalisée à partir de la détection de l'allèle A de Melon\_sbg\_14207\_58, en combinaison avec l'absence de détection de tout

25 autre allèle pour ce SNP, et, en particulier, l'absence de détection de l'allèle C.

Outre l'introgression des séquences conférant une résistance (ou une tolérance, en fonction des conditions d'infection) aux infections par le ToLCNDV, par croisement, tel que détaillé dans les méthodes de l'invention, ces séquences de l'invention peuvent être également introduites

30 dans le patrimoine génétique de *C. melo* subsp. *melo* par génie génétique, de manière à obtenir une plante de *C. melo* subsp. *melo* commerciale, résistant au ToLCNDV. L'identification et le clonage des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, conférant le phénotype désiré, *inter alia* à partir du dépôt NCIMB 42506, peuvent être effectués par l'homme du métier, sur la base des informations de séquences données dans la présente demande et le

35 matériel déposé.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne également des plantes hybrides de *C. melo* subsp. *melo* obtenues par croisement d'une plante résistante, selon le premier aspect de

l'invention, ou d'une plante résistante, obtenue par les méthodes décrites ci-dessus avec une plante de *C. melo* subsp. *melo*, par exemple, une plante sensible à l'infection par ToLCNDV, ou une plante avec un niveau de résistance différent à l'infection, par ToLCNDV.

Une plante hybride particulièrement préférée de *C. melo* subsp. *melo*, est une plante qui  
5 possède un caractère ou phénotype d'intérêt agronomique.

### Légende des figures

La FIG.1 illustre le tracé Manhattan des résultats de cartographie de la population RIL. L'axe vertical (axe y) montre le  $-\log_{10}$  (valeur p) et l'axe horizontal (axe x) représente la position de  
10 tous les SNP (en centimorgan (cM)) par chromosome le long de la carte génétique.

La FIG.2 illustre un zoom de la Fig.1 dans le chromosome 11. L'axe vertical montre  $-\log_{10}$  (valeur p) et l'axe horizontal représente la position de tous les SNP (Mbp) cartographiée sur le génome du Melon.

La FIG. 3 est un tracé mosaïque montrant des fréquences de phénotypes pour chaque groupe  
15 génotypique déterminé par « Melon\_sbg\_14207\_58 ». Ce SNP prédit globalement le phénotype de 81% de RIL. Les proportions R (résistant) et S (sensible) sont indiquées, respectivement, par des couleurs blanche et noire.

### EXEMPLES

#### 20 **Exemple 1 : Inoculation du ToLCNDV médiée par un insecte et criblage de la maladie :**

Le virus New Delhi des feuilles enroulées de la tomate (ToLCNDV) est causé par un géminivirus transmis par la mouche blanche. L'identification d'une source de résistance consiste à développer un système de phénotypage basé sur les quatre aspects suivants, dont la répétabilité et la fiabilité doivent être validées :

- 25
- croissance et maintien du virus,
  - croissance et maintien du vecteur,
  - inoculation
  - et méthodologies de criblage.

#### **Croissance et maintien du virus**

30 Le virus New Delhi des feuilles enroulées de la tomate (ToLCNDV) a été maintenu sur des courges infectées isolées (*Cucurbita pepo*) cultivées dans des cages à l'abri des insectes, contrôlées en éclairage naturel et température (25°C le jour et 20 °C la nuit). Des cultures du ToLCNDV ont été maintenues sur des courges sensibles (*Cucurbita pepo*) « Victoria F1 » (HM.Clause) (confirmant ainsi que le ToLCNDV est en effet une souche, à l'origine des  
35 symptômes graves décrits ci-dessus).

On notera que la présence du ToLCNDV a été confirmée par PCR, comme décrit dans Ruiz *et coll.* 2015, et l'absence de CVYV et de CYSDV confirmée selon Ruiz *et coll.* 2006.

#### **Maintien de la mouche blanche**

Des colonies de mouches blanches (*Bemisia tabaci*, biotype B) ont été élevées sur des aubergines (*Solanum melongena* L.) cultivées dans des cages couvertes de mousseline, maintenues à l'intérieur d'une serre protégée contre les insectes, contrôlée en éclairage naturel et température (25°C le jour et 20 °C la nuit). Des mouches blanches adultes ont été inoculées  
5 avec une période d'accès à l'acquisition de 48 h sur des courges (*Cucurbita pepo*) 'Victoria F1) infectées par le ToLCNDV.

#### **Inoculation de plantes**

La période d'accès à l'acquisition a été suivie d'une période d'accès à l'inoculation de 72 h sur les melons (*Cucumis melo*) dont la résistance au ToLCNDV sera contrôlée, lesdites plantes  
10 étant parvenues à l'un des stades de développement des feuilles. L'infestation des plantes a été constatée après avoir observé la présence d'au moins 10 mouches blanches par melon. Après la période d'accès à l'inoculation, les mouches blanches ont été éliminées en traitant les plantes à l'imidaclopride (Confidor; Bayer, Leverkusen, Allemagne). Les plantes ont été transplantées dans la serre (à l'abri des insectes et contrôlées en éclairage naturel et température (30° C le  
15 jour et 25° C la nuit)) au printemps et à la fin de l'été / de l'automne, respectivement (avril et août), pendant une période d'incubation de six semaines.

#### **Dépistage de la maladie**

Le développement de symptômes (feuilles dans la partie supérieure de la plante montrant une mosaïque jaune, un flétrissement et un rabougrissement des plantes) a été suivi et enregistré  
20 45 jours après l'inoculation (DPI) en utilisant trois niveaux, à savoir, résistant (pas de symptôme), intermédiaire (mosaïque jaune modérée) ou sensible (symptomatique, avec mosaïque jaune, flétrissement et rabougrissement prononcés).

#### **Exemple 2 : Inoculation mécanique de ToLCNDV**

25 En plus de l'inoculation médiée par un insecte, décrite dans l'exemple 1, les présents inventeurs ont également mis au point un test basé sur l'inoculation mécanique. Des courges naturellement infectées par le ToLCNDV ont été recueillies à Almeria, et le virus isolé. Les feuilles infectées ont été conservées dans un sac en plastique à -80°C avant d'être utilisées. 1g feuilles infectées a été broyé avec 4ml d'un tampon de 0,03M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH9) contenant 0,2% de  
30 diéthylthiocarbamate de sodium avec du carborundum (7,5%) et du charbon actif (10%). Les deux cotylédons de jeunes plants encore dépourvus de leur première feuille sont inoculés en les frottant doucement, puis les plants sont rincés. Les plants sont alors maintenus dans une chambre de croissance à une température de 25° C pendant 14 heures le jour et de 20° C pendant 10 heures, la nuit. Une seconde inoculation être réalisée une semaine après la  
35 première, afin de provoquer l'infection.

Une première notation est effectuée 3 semaines après l'inoculation ; lorsque le contrôle de sensibilité fait clairement apparaître les symptômes, une seconde notation est effectuée une semaine plus tard pour confirmer les réactions. L'évaluation s'effectue sur une échelle de 1 à 9,

où 1 correspond à des plantes présentant des symptômes sévères (bombement des feuilles, rabougrissement des plantes), 3 correspond aux plantes montrant des symptômes évidents, tels que mosaïque ou éclaircissement des nervures et début de déformation des feuilles, 5 correspond aux plantes présentant des symptômes modérés, tels que mosaïque jaune, 7 correspond aux plantes ne présentant que des symptômes peu prononcés, à savoir, léger jaunissement ou enroulement des feuilles, et 9 correspond aux plantes sans symptômes.

**Exemple 3 : identification d'une source de résistance au ToLCNDV par inoculation médiée par un insecte**

- 10 Comme point de départ de la réalisation de l'invention, les présents inventeurs ont mené plusieurs expériences pour déterminer la résistance au ToLCNDV chez plusieurs plantes de *Cucumis melo*, à la fois à partir de *Cucumis melo* subsp. *agrestis* et de *Cucumis melo* subsp. *melo*. On notera qu'à ce jour, *Cucumis melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* n'a pas été identifié comme source possible de résistance au ToLCNDV.
- 15 Un groupe de 27 hybrides commerciaux de *Cucumis melo* subsp. *melo* et 8 *Cucumis melo* subsp. *agrestis* et *Cucumis melo* subsp. *melo* ont été sélectionnés selon le procédé décrit dans l'Exemple 1. Un contrôle sensible a été ajouté comme témoin.

Tableau 1 : Contrôle de la résistance des plantes

| Identifiant de plantes et type de plantes contrôlées                           | Nombre de plantes résistantes | Nombre de plantes intermédiaires | Nombre de plantes sensibles | Nombre total de plantes |
|--|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| H-MLCND-1 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Galia  | 0                             | 0                                | 10                          | 10                      |
| H-MLCND-2 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Galia  | 0                             | 0                                | 5                           | 5                       |
| H-MLCND-3 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Galia  | 0                             | 0                                | 10                          | 10                      |
| H-MLCND-4 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Galia  | 0                             | 0                                | 10                          | 10                      |
| H-MLCND-5 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Galia  | 0                             | 0                                | 5                           | 5                       |
| H-MLCND-6 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Galia  | 0                             | 0                                | 10                          | 10                      |
| H-MLCND-7 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Galia  | 0                             | 0                                | 10                          | 10                      |
| H-MLCND-8 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Galia  | 0                             | 0                                | 10                          | 10                      |
| H-MLCND-9 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Galia  | 0                             | 0                                | 5                           | 5                       |
| H-MLCND-10 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0                             | 0                                | 7                           | 7                       |
| H-MLCND-11 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i> var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0                             | 0                                | 7                           | 7                       |

|   |   |   |    |    |
|---|---|---|----|----|
| H-MLCND-12 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 10 | 10 |
| H-MLCND-13 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 10 | 10 |
| H-MLCND-14 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 3 | 6  | 9  |
| H-MLCND-15 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 10 | 10 |
| H-MLCND-16 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 8  | 8  |
| H-MLCND-17 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 8  | 8  |
| H-MLCND-18 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 8  | 8  |
| H-MLCND-19 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 5  | 5  |
| H-MLCND-20 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 10 | 10 |
| H-MLCND-21 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 10 | 10 |
| H-MLCND-22 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 10 | 10 |
| H-MLCND-23 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 1 | 9  | 10 |
| H-MLCND-24 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 10 | 10 |
| H-MLCND-25 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 10 | 10 |
| H-MLCND-26 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>cantalupensis</i> Galia | 0 | 0 | 10 | 10 |
| H-MLCND-27 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>ameri ananas</i>        | 0 | 0 | 10 | 10 |
| H-MLCND-28 : <i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i><br>var. <i>ameri ananas</i>        | 0 | 0 | 10 | 10 |
| H-MLCND-31 : <i>C. melo</i> subsp.<br><i>agrestis</i> var. <i>chinensis</i>       | 0 | 7 | 2  | 9  |
| H-MLCND-32 : <i>C. melo</i> subsp.<br><i>agrestis</i> var. <i>acidulous</i>       | 4 | 2 | 1  | 7  |
| H-MLCND-33 : <i>Non défini</i>  | 0 | 6 | 0  | 6  |
| H-MLCND-34 : <i>Non défini</i>  | 0 | 0 | 10 | 10 |
| H-MLCND-35 : <i>Non défini</i>  | 4 | 5 | 1  | 10 |
| H-MLCND-36 : <i>Non défini</i>  | 0 | 7 | 0  | 7  |

Deux principaux plants résistants ont été identifiés, à savoir, H-MLCND-32 et H-MLCND-35. Le lead H-MLCND-32 a été choisi par les présents inventeurs comme source possible de résistance au ToLCNDV. Il s'agit d'un *Cucumis melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, avec une 5 chair blanc-vert, ferme et croquante, et une faible teneur en sucre (valeur brix : 5,5) et sans arôme, caractéristiques qui rendraient tout melon non commercialisable.

**Exemple 4 : Phénotypage d'une population de cartographie RIL**

82 lignées pures recombinantes (RIL Recombinant Inbred Lines) ont été sélectionnées pour réaliser une expérience de cartographie génétique. Ces lignées (F6-F8) ont été développées par filiation monograinée à partir d'un croisement entre *C. melo* subsp *agrestis* var. *acidulous* H-MLCND-32, et une lignée sensible de *C. melo* subsp. *melo* Ventrantais. Les lignées ont été infectées comme décrit dans l'exemple 1, puis transplantées dans la serre et sélectionnées pour leur résistance contre le ToLCNDV, selon la notation de dépistage de maladie décrite dans l'exemple 1. On notera qu'aucune des plantes contrôlées n'a été évaluée comme « intermédiaire ». L'expérience a été menée en blocs aléatoires complets avec 4 répétitions de plantes isolées. Un bloc de plantes non infectées a, de plus, été cultivé dans la serre pour permettre la comparaison entre les plantes infectées et non infectées de chaque lignée.

Tableau 2: niveau de résistance des 82 RIL et des 2 parents récurrents. R correspond à résistant, S à sensible.

| RIL     | Phénotype | RIL     | Phénotype | RIL       | Phénotype | RIL         | Phénotype |
|---------|-----------|---------|-----------|-----------|-----------|-------------|-----------|
| RIL -1  | R         | RIL -2  | S         | RIL -3    | S         | RIL -4      | S         |
| RIL -5  | S         | RIL -6  | S         | RIL -7    | R         | RIL -8      | S         |
| RIL -9  | R         | RIL -10 | S         | RIL -11   | S         | RIL -12     | R         |
| RIL -13 | R         | RIL -14 | S         | RIL -15   | S         | RIL -16     | R         |
| RIL -17 | S         | RIL -18 | R         | RIL -19   | R         | RIL -20     | S         |
| RIL -21 | S         | RIL -22 | R         | RIL -23   | S         | RIL -24     | S         |
| RIL -25 | S         | RIL -26 | R         | RIL -27   | S         | RIL -28     | R         |
| RIL -29 | R         | RIL -30 | R         | RIL -31   | S         | RIL -32     | S         |
| RIL -33 | R         | RIL -34 | R         | RIL -35   | R         | RIL -36     | S         |
| RIL -37 | S         | RIL -38 | S         | RIL -39   | R         | RIL -40     | R         |
| RIL -41 | R         | RIL -42 | S         | RIL -43   | R         | RIL -44     | R         |
| RIL -45 | S         | RIL -46 | S         | RIL -47   | R         | RIL -48     | R         |
| RIL -49 | S         | RIL -50 | R         | RIL -51   | S         | RIL -52     | R         |
| RIL -53 | S         | RIL -54 | S         | RIL -55   | S         | RIL -56     | R         |
| RIL -57 | R         | RIL -58 | S         | RIL -59   | R         | RIL -60     | S         |
| RIL -61 | S         | RIL -62 | R         | RIL -63   | R         | RIL -64     | S         |
| RIL -65 | R         | RIL -66 | R         | RIL -67   | S         | RIL -68     | R         |
| RIL -69 | R         | RIL -70 | S         | RIL -71   | S         | RIL -72     | S         |
| RIL -73 | R         | RIL -74 | R         | RIL -75   | R         | RIL -76     | S         |
| RIL -77 | S         | RIL -78 | R         | RIL -79   | R         | RIL -80     | S         |
| RIL -81 | S         | RIL -82 | R         | HMLCND-32 | R         | Ventrantais | S         |

**Exemple 5 : Confirmation de la résistance**

Une plante dérivée du même *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* H-MLCND-32 a été utilisée dans une étude pathologique d'essai d'inoculation mécanique de ToLCNDV, selon l'exemple 2, 5 et a confirmé la résistance.

**Exemple 6 : Déterminisme génétique de la résistance**

Un essai a été réalisé pour identifier le déterminisme génétique de la résistance identifiée dans *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* H-MLCND-32 : La plante de l'exemple 5 a été croisée avec une lignée propre au déposant de melons sensibles et les plantes descendantes F1 ont été inoculées et notées selon le protocole de l'exemple 2, dans lequel la notation 1 ou 3 correspondra à des plantes sensibles, 5 à des plantes à résistance intermédiaire présentant des symptômes modérés, et 7 et 9 à des plantes résistantes. La résistance a été identifiée au préalable comme résistance récessive puisque l'ensemble des plantes F1 ont été notées sensibles.

15 La notation a été répétée sur les plantes F2, qui a confirmé l'identification préalable comme héritage récessif monogénique de la résistance (1/4 des plantes résistantes et 3/4 des plantes sensibles).

Tableau 3 : notation des plantes F2. R= résistante, S= sensible, IR= intermédiaire

| Plante                  | Nombre de plantes | R  | IR | S   | Rapport observé | Rapport prévu | valeur p |
|-------------------------|-------------------|----|----|-----|-----------------|---------------|----------|
| Contrôle de sensibilité | 26                | 0  | 0  | 26  | 0:26            | 0:26          |          |
| Parent sensible         | 10                | 0  | 0  | 10  | 0:10            | 0:10          |          |
| Parent résistant        | 10                | 9  | 1  | 0   | 9:1             | 1:0           | 0,3049   |
| Plante F1               | 10                | 0  | 0  | 10  | 0:10            | 0:10          |          |
| Plante F2               | 206               | 39 | 9  | 158 | 39:167          | 52:154        | 0,1226   |

20

Chaque plante a été notée et des analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel JMP (SAS) (logiciel statistique). Ces données qualitatives ont été analysées selon des analyses statistiques non paramétriques (K $\chi^2$ ). La valeur p montre que les différences entre le rapport prévu et le rapport observé pour un gène récessif ne sont pas significativement différentes, du point de vue 25 statistique.

**Exemple 7 : Développement de données génétiques et de marqueurs moléculaires**Génotypage SNP (génotypage à base de séquence)

La procédure de séquençage a commencé par une analyse *in silico* pour sélectionner la 30 meilleure combinaison d'amorces (CA), à savoir pour choisir une CA qui génère le moins

possible de fragments dans les organites. L'ADN des RIL, et des deux parents ont ensuite servi à générer une bibliothèque basée sur la méthode de détection du polymorphisme de longueur de fragment amplifié (AFLP) à haut rendement, mise au point par Keygene (voir les documents WO2007/073165 et WO2008/007951). Dans le cas présent, l'ADN a été digéré par EcoRI et MseI, et des adaptateurs ont été ajoutés. Ces adaptateurs contiennent en outre des bases sélectives qui permettent de réduire le génome à séquencer. Selon la nomenclature décrite par Keygene, la bibliothèque est une EcoRI/MseI +0/+2, à savoir qu'aucune base sélective n'a été ajoutée à l'extrémité 3' de l'amorce complémentaire au site de restriction réalisé par la digestion de EcoRI, alors que 2 bases sélectives ont été ajoutées à l'extrémité 3' de l'amorce complémentaire au site de restriction réalisé par MseI. La bibliothèque a été préparée pour le séquençage des extrémités sur le système HiSeq d'Illumina. Cette bibliothèque a été utilisée pour la découverte et le génotypage des SNP. Les données Illumina ont été filtrées en fonction de la qualité, la présence d'étiquettes d'identification d'échantillons et le motif de site de restriction. Des étiquettes d'identification d'échantillons ont été retirées des données restantes.

Une référence a ensuite été créée : des données de l'ensemble des échantillons ayant passé le pré-traitement ont été combinées et groupées. Dans l'idéal, chaque groupe représente un fragment de restriction simple, et chaque fragment de restriction est représenté par un groupe simple. Une séquence simple a été sélectionnée dans chaque groupe comme représentative du fragment de restriction correspondant. Ces séquences forment l'ensemble de référence. Les lectures filtrées ont été ensuite cartographiées d'après la référence à l'aide du « logiciel BWA » et génotypées pour les SNP en utilisant le logiciel GATK UnifiedGenotyper. D'autres informations sur le génotypage à base de séquence, ainsi que sur les kits de réalisation de ces procédés, comme, par exemple, le SBG 100-Kit, peuvent être obtenues auprès de Keygene B.V.

#### 25 Marqueurs d'identification liés de manière significative à la résistance au ToLCNDV

**Données phénotypiques :** Les données phénotypiques ont été collectées comme décrit dans l'exemple 4.

**Analyse de liaison :** Les informations de génotypage décrites dans la section génotypage des SNP et les mesures phénotypiques ont été utilisées comme entrée de l'analyse de liaison par le test de Chi carré, (JMP), à savoir que, pour chaque marqueur, les fréquences de lignées résistantes et sensibles ont été comparées entre les groupes génotypiques.

#### Résultats

L'analyse de liaison a identifié un QTL unique important sur le chromosome 11, défini par un ensemble de marqueurs liés de manière significative à la résistance au ToLCNDV. La Fig.1, qui montre les résultats de la cartographie de la population RIL, illustre ce point. La Fig.2, spécifique au chromosome 11, illustre la partie relative au chromosome 11 portant ce QTL important.

Le tableau 4 récapitule la liste de marqueurs associés et leur significativité. Les SNP ont été physiquement cartographiés sur la carte génomique des melons disponible ([https://melonomics.net/files/Genome/Melon\\_genome\\_v3.5.1/](https://melonomics.net/files/Genome/Melon_genome_v3.5.1/)).

**5 Exemple 8 : définition du fragment introgressé conférant une résistance non liée aux caractéristiques de non commercialisation.**

La valeur p obtenue pour chaque marqueur SNP, et le phénotype des différentes RIL présentant l'allèle du marqueur SNP lié à la résistance, ont été pris en considération afin de définir le fragment introgressé, conférant la résistance au ToLCNDV, lorsqu'il est présent à l'état homozygote sans conférer de caractéristiques incompatibles avec la commercialisation. Les trois lignées RIL-30, RIL-69 et RIL-82, ayant des fruits montrant le phénotype de melons commercialisables, ont été conservées. Leur génotype pour le SNP identifié dans les exemples précédents, est indiqué dans le tableau 5.

**Tableau 4- SNP liés à la résistance au ToLCNDV, position et séquences adjacentes :**

Pos. : Position sur le chromosome 11 - Nt R : Nucléotide dans le groupe résistant, correspondant aux allèles de le groupe sensible. Il convient de se rappeler qu'en dehors du fragment d'introgression de l'invention, délimité par Melon\_sbg\_16835\_17, de préférence, par Melon\_sbg\_33761\_74 et Melon\_sbg\_22016\_36, l'association avec 5 est très faible.

| SNP                | Séquence entourant le SNP   | Limite gauche  | Limite droite | Position de SNP | Vale |
|--------------------|---|----------------|---------------|-----------------|------|
| Melon_sbg_2869_86  | TCACGCCGTGTTTTCAACGCACAAATTGAATT<br>TCCGACACCCTTATATTATTATCACCTCCACT<br>CCCCACCGCCGCGCCTCTC[C/T]CGC   | 28 024 90<br>0 | 28 024 988    | 28 024 985      | 0,00 |
| Melon_sbg_3859_5   | ACCG[G/T]CGACTCATTGGTCCGGCGACAGA<br>GGAGAGAGAGAGAGATTGATGCTCAAGCGTG<br>CGAGCATGCGAGGGGAAGGGTTTCGCACGC | 28 404 86<br>9 | 28 404 957    | 28 404 873      | 0,00 |
| Melon_sbg_21303_5  | ACCG[G/T]CGACTCATTGGTCCGGCGACAGA<br>GGAGAGAGAGAGATTGATGCTCAAGCGTGCG<br>AGCATGCGAGGGGAAGGGTTTCGCACGCGC | 28 404 86<br>9 | 28 404 959    | 28 404 873      | 0,00 |
| Melon_sbg_15226_34 | GAGGCAGTCTTCTCCCATGTAGACTTCATTC<br>T[T/A]CCCGTGGAATAGATCGAATACGTAACC<br>GATGATCCCGCCGGAACGAAGGTTCCGT  | 28 468 74<br>7 | 28 468 835    | 28 468 780      | 0,00 |
| Melon_sbg_40291_40 | GCACCCGATTGATCTTCAAGACGTGTTGTTAC<br>GTCTTAC[T/A]TTTGATAATATTTGTGGTTTGG<br>CTTTTGAAAAGATCCAATGACTTGTG  | 28 469 42<br>4 | 28 469 512    | 28 469 463      | 0,00 |

| SNP                | Séquence entourant le SNP   | Limite gauche  | Limite droite | Position de SNP | Vale |
|--------------------|---|----------------|---------------|-----------------|------|
| Melon_sbg_8091_11  | ACCGGGGCGG[C/T]GGCTTTCAGGACGTTGA<br>AGGAAAATGAATGGACCAAACGAGAACGACC<br>AAAGTGGGTTCGACGTCCAAATCAGCATTTTC | 28 524 91<br>7 | 28 525 005    | 28 524 927      | 0,00 |
| Melon_sbg_29917_65 | GGAGCAATGCGACGACGCCGTCACCGTCTG<br>ACGTGGAGGAGTTGGATTATGTGGAAGACGA<br>TGA[C/G]GACGATGAGGAGGAGGAGGACGGC   | 28 541 41<br>1 | 28 541 499    | 28 541 475      | 0,00 |
| Melon_sbg_1548_24  | CACGGCTGCATTCTAGCACCAT[T/A]GGCCA<br>AATGTCTAACCTCAACCAAATTCTTTCTCG<br>GCAACAAGCTCGGTGGTTGTTCCACC        | 28 547 66<br>0 | 28 547 748    | 28 547 683      | 0,00 |
| Melon_sbg_22966_49 | TTGTTTGGAGAGTCTGGCTTGCGGCGTTCCA<br>ACCGTGGCGTTTCCACA[G/A]TGGTCCGATCA<br>AGCGACCAACACTAAGATCATTTCAGGACT  | 28 815 31<br>0 | 28 815 398    | 28 815 381      | 0,00 |
| Melon_sbg_22966_72 | TTGTTTGGAGAGTCTGGCTTGCGGCGTTCCA<br>ACCGTGGCGTTTCCACAGTGGTCCGATCAAG<br>CGACCAACA[C/G]TAAGATCATTTCAGGACT  | 28 815 31<br>0 | 28 815 398    | 28 815 358      | 0,00 |
| Melon_sbg_617_42   | AACCAAAGTACCTGTTGGGGCTCTTTCCCGT<br>CAATCCGGTC[G/T]GGCTCCGCATGTGCCACA<br>GCTACAATGTGGCGTCTGGCCAAACCGGT   | 28 922 00<br>5 | 28 922 093    | 28 922 046      | 0,00 |
| Melon_sbg_617_84   | AACCAAAGTACCTGTTGGGGCTCTTTCCCGT<br>CAATCCGGTCGGGCTCCGCATGTGCCACAGC<br>TACAATGTGGCGTCTGGCCAA[AG]CCGGT    | 28 922 00<br>5 | 28 922 093    | 28 922 088      | 0,00 |

| SNP                | Séquence entourant le SNP  | Limite gauche  | Limite droite | Position de SNP | Valeur p |
|--------------------|--|----------------|---------------|-----------------|----------|
| Melon_sbg_20578_63 | CTTTGTCGAAAGCGTATGAACGCCGTGCGAG<br>TGAAATTCAATTTATGAAACCAATAAATTCA[A/<br>T]AGAAGAATAATAAACATGCTTCTCAT  | 29 092 88<br>6 | 29 092 974    | 29 092 967      | 0,000    |
| Melon_sbg_20578_82 | CTTTGTCGAAAGCGTATGAACGCCGTGCGAG<br>TGAAATTCAATTTATGAAACCAATAAATTCAAAA<br>GAAGAATAATAAACATG[C/A]TTCTCAT | 29 092 88<br>6 | 29 092 974    | 29 092 948      | 0,000    |
| Melon_sbg_55680_17 | GACAACCAACTTTACC[G/A]ATAACCTTCCCG<br>ATCTGCTTGAGGGGCACAACGATTCTGAAAA<br>GCACGTCGTGGGCCCTTCGCTTGTCTTTA  | 29 307 65<br>2 | 29 307 740    | 29 307 668      | 0,000    |
| Melon_sbg_60684_74 | TATCCCTCCACTCGTCTCATTATGATGTCCT<br>CCTTTGGGTGTTTGGGTGCACAACCTATGTTC<br>TTAGCCATG[G/A]TCCTAACCAAATAA    | 29 618 68<br>9 | 29 618 777    | 29 618 762      | 8,78%    |
| Melon_sbg_33761_74 | CTCAGATAATCAACCTCTGGTACGACTGGCC<br>TAATGGTCGGAACCTCAACATCATCCAACACC<br>AGCTCGGCAA[C/T]GTTCTCTACGACCTC  | 30 171 02<br>1 | 30 171 109    | 30 171 094      | 3,58%    |
| Melon_sbg_2720_78  | AACCAACACTGTTTCTTGTGAAAATTGTTTGG<br>TTGTTATATCTGTATGCAGAGGCCTATTATGT<br>GGTGCTTTGATGG[G/A]TGGTTTAGAAT  | 30 328 01<br>8 | 30 328 106    | 30 328 095      | 7,28%    |
| Melon_sbg_14207_58 | GGCCTAAAAAATCGTAGCATTATAGAGAAAT<br>GCAAACAAGGGTAGAAGGGTAGAAG[C/A]GC<br>TTGCCTTGTACAAGAACTCCGCATAGTTA   | 30 335 96<br>2 | 30 336 050    | 30 336 019      | 2,52%    |

| SNP                | Séquence entourant le SNP  | Limite gauche  | Limite droite | Position de SNP | Valeur p |
|--------------------|--|----------------|---------------|-----------------|----------|
| Melon_sbg_22016_27 | CCACCTGAAGACGTGGAGATCCAACG[G/C]TC<br>GAGATCGAACCGTAACGGCCTCGCCAAAATC<br>CAACGGCAAAAACTAGCGAAAGTGGAAG | 30 391 94<br>0 | 30 392 028    | 30 391 966      | 3,437    |
| Melon_sbg_22016_30 | CCACCTGAAGACGTGGAGATCCAACGGTC[G/A]<br>AGATCGAACCGTAACGGCCTCGCCAAAATC<br>CAACGGCAAAAACTAGCGAAAGTGGAAG | 30 391 94<br>0 | 30 392 028    | 30 391 969      | 3,437    |
| Melon_sbg_22016_36 | CCACCTGAAGACGTGGAGATCCAACGGTCGA<br>GATC[G/A]AACCGTAACGGCCTCGCCAAAATC<br>CAACGGCAAAAACTAGCGAAAGTGGAAG | 30 391 94<br>0 | 30 392 028    | 30 391 975      | 3,437    |
| Melon_sbg_11556_13 | TCGAGCCAAAGA[C/T]TGAAGATCACCATCTT<br>CACCCATCTGATCTTGATAATCAACTGGGTTC<br>AGAAAGCTATTTGTCATTTGTTACAAC | 31 136 53<br>0 | 31 136 618    | 31 136 542      | 8,78     |
| Melon_sbg_24259_45 | TGGTGGGATTTGAATCCAAGATGTCTGTCAGT<br>GCTTCTTCTCA[C/G]ACCGCAGGGATTGGAC<br>AAAAGCCGGACAGCGCGGTGATGCGCCG | 31 159 06<br>4 | 31 159 152    | 31 159 108      | 8,78     |
| Melon_sbg_16835_5  | CCAG[C/T]GGTCTTCGTTCGGCGGCGGCGATT<br>GAGTCTACTCCGTTTTCAACTCCGACGC<br>AGGGCTGCAAATTTGATTATCGAGGGAAAA  | 31 209 20<br>0 | 31 209 288    | 31 209 204      | 8,78     |
| Melon_sbg_16835_17 | CCAGCGGTCTTCGTTCG[G/T]CGGCGGCGATT<br>GAGTCTACTCCGTTTTCAACTCCGACGC<br>AGGGCTGCAAATTTGATTATCGAGGGAAAA  | 31 209 20<br>0 | 31 209 288    | 31 209 216      | 5,81     |

Les semences des RIL 69 et 82 ont été déposées par Hazera Seeds Ltd, Berurim, M.P. Shikmim 79837, Israël, auprès de la NCIMB (NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Royaume-Uni), le 23 décembre 2015, sous le nom ToLR1 et le numéro d'ordre NCIMB 42506. Certaines de leurs caractéristiques sont étudiées dans

5 l'exemple 10. Elles se caractérisent également par les spécificités suivantes : la fleur femelle se répartit le long des pousses, les pousses ne sont pas fines et longues comme dans les types sauvages. Les RIL prises à l'entre-nœud 8-15 sont similaires aux plantes de culture ; il n'y a pas de fortes ramifications.

10 Tableau 5 :

| SNP                | RIL -30 | RIL -69 | RIL -82 | <u>H-MLCND-32</u> |
|--------------------|---------|---------|---------|-------------------|
| Melon_sbg_2869_86  | T/T     | T/T     | T/T     | <u>T/T</u>        |
| Melon_sbg_3859_5   | G/G     | T/T     | T/T     | <u>T/T</u>        |
| Melon_sbg_21303_5  | G/G     | T/T     | T/T     | <u>T/T</u>        |
| Melon_sbg_15226_34 | A/A     | T/T     | T/T     | <u>T/T</u>        |
| Melon_sbg_40291_40 | NA      | A/A     | A/A     | <u>A/A</u>        |
| Melon_sbg_8091_11  | T/T     | C/C     | C/C     | <u>C/C</u>        |
| Melon_sbg_29917_65 | C/C     | G/G     | G/G     | <u>G/G</u>        |
| Melon_sbg_1548_24  | A/A     | T/T     | T/T     | <u>T/T</u>        |
| Melon_sbg_22966_49 | NA      | A/A     | NA      | <u>A/A</u>        |
| Melon_sbg_22966_72 | NA      | G/G     | NA      | <u>G/G</u>        |
| Melon_sbg_617_42   | G/G     | T/T     | T/T     | <u>T/T</u>        |
| Melon_sbg_617_84   | A/A     | G/G     | G/G     | <u>G/G</u>        |
| Melon_sbg_20578_63 | T/T     | A/A     | A/A     | <u>A/A</u>        |
| Melon_sbg_20578_82 | A/A     | C/C     | C/C     | <u>C/C</u>        |
| Melon_sbg_55680_17 | G/G     | A/A     | A/A     | <u>A/A</u>        |
| Melon_sbg_60684_74 | NA      | A/A     | A/A     | <u>A/A</u>        |
| Melon_sbg_33761_74 | T/T     | T/T     | T/T     | <u>T/T</u>        |
| Melon_sbg_2720_78  | G/G     | G/G     | G/G     | <u>G/G</u>        |
| Melon_sbg_14207_58 | A/A     | A/A     | A/A     | <u>A/A</u>        |
| Melon_sbg_22016_27 | G/G     | G/G     | G/G     | <u>G/G</u>        |
| Melon_sbg_22016_30 | G/G     | G/G     | G/G     | <u>G/G</u>        |
| Melon_sbg_22016_36 | G/G     | G/G     | G/G     | <u>G/G</u>        |
| Melon_sbg_11556_13 | C/C     | C/C     | C/C     | <u>C/C</u>        |
| Melon_sbg_24259_45 | C/C     | C/C     | C/C     | <u>C/C</u>        |
| Melon_sbg_16835_5  | T/T     | T/T     | T/T     | <u>T/T</u>        |
| Melon_sbg_16835_17 | T/T     | T/T     | T/T     | <u>T/T</u>        |

**Exemple 9 : Valeur de prédiction des marqueurs**

La Fig. 3 est un tracé mosaïque montrant des fréquences de phénotypes pour chaque groupe génotypique déterminé par « Melon\_sbg\_14207\_58 » (SEQ ID N°9). Ce SNP prédit 5 globalement le phénotype de 81% de RIL.

**Exemple 10 : Plants de *Cucumis melo* subsp *melo* résistant au ToLCNDV**

Une fois la résistance identifiée, les présents inventeurs ont pu obtenir des plants de *Cucumis melo subsp melo* résistant au ToLCNDV ne présentant pas les caractéristiques phénotypiques 10 du plant de *Cucumis melo subsp agrestis var. acidulous* d'origine, en particulier, concernant la valeur brix et la couleur de la chair.

Le Tableau 6 illustre le caractère phénotypique de ces plants.

Tableau 6

| Plante     | Résistance au ToLCNDV | Valeur brix | Forme du fruit | Couleur de la chair |
|------------|-----------------------|-------------|----------------|---------------------|
| RIL -30    | Résistant             | 12          | Ovale          | OR1                 |
| RIL -66    | Résistant             | 9           | Ovale          | Blanc-vert          |
| RIL 69     | Résistant             | 9           | Rond-Ovale     | OR1                 |
| RIL 82     | Résistant             | 10          | Ovale          | OR-Crm              |
| Vedrantais | Sensible              | 12          | Rond           | OR1-OR2             |
| H-MLCND-32 | Résistant             | 5,5         | Ovale          | Blanc-vert          |

15

Dans le tableau 6, « orangé » OR1 est la couleur standard de la chair orange du melon du commerce. OR-Crm signifie que la chair est de couleur mélangée (taches de couleur crème).

Échelle de couleur orange, de clair à foncé :

OR0 – orange clair ; OR1 – orangé ; OR2 – orange foncé ; OR3 – orange très foncé

20

Une analyse génétique montre que les plants résistants présentent les séquences introgressées contenant la résistance telle que mise en évidence par la présence du SNP identifié par les présents inventeurs.

| Plant  | Melon_sbg_22016_27 | Melon_sbg_14207_58 | Melon_sbg_2720_78 |
|--------|--------------------|--------------------|-------------------|
| RIL 30 | G/G                | A/A                | G/G               |
| RIL 66 | G/G                | A/A                | G/G               |
| RIL69  | G/G                | A/A                | G/G               |
| RIL82  | G/G                | A/A                | G/G               |

|            |     |     |     |
|------------|-----|-----|-----|
| Vedrantais | C/C | C/C | A/A |
| H-MLCND-32 | G/G | A/A | G/G |

## RÉFÉRENCES

- Fauquet, C. M.,** Briddon, R. W., Brown, J. K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., and  
5 Zhou, X., 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Arch. Virol. 153:783-821.
- Funayama, S.** 2001. Effects of Virus Infection and Light Environment on Population  
Dynamics of *Eupatorium makinoi* (Asteraceae). American Journal of Botany 88: 616.
- Garcia-Mas, J. et coll.** 2012. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). Proc Natl Acad  
Sci U S A. 109(29):11872-7.
- 10 **Islam, S. et al.** 2011. Screening of *Luffa cylindrica* Roem against tomato leaf curl New  
Delhi virus, inheritance of resistance and identification of SRAP markers linked to resistance  
gene. Journal of Horticulture Science and Biotechnology 86(6):661-667.
- Kirkbride, J. H., Jr.** 1993. Biosystematic monograph of the genus *Cucumis*  
(Cucurbitaceae). 84.
- 15 **Lopez, C. et al.** 2015. Mechanical transmission of Tomato leaf curl New Delhi virus to  
cucurbit germplasm: selection of tolerance sources in *Cucumis melo*. Euphytica 204:679-691
- Pitrat, M. P.** Hanelt et K. Hammer. 2000. Some comments on intraspecific classification  
of cultivars of melon. Acta Hort. 510:29-36.
- Ruiz L. et coll.** 2006. Analysis of the temporal and spatial disease progress of *Bemisia*  
20 *tabaci*-transmitted Cucurbit yellow stunting disorder virus and Cucumber vein yellowing virus in  
cucumber. Plant Pathology 55(2): 264-275.
- Ruiz L. et coll.** 2015. First Report of Tomato leaf curl New Delhi virus Infecting Tomato  
in Spain. Plant Disease 99(6):684.
- Saeed M. et coll.** 2007. A monopartite begomovirus-associated DNA beta satellite  
25 substitutes for the DNA B of a bipartite begomovirus to permit systemic infection. J Gen Virol.  
88(Pt 10):2881-9.

B11542AD\_B11542AD\_SQL\_ST25 (version FR)  
LISTE DES SEQUENCES

<110> VILMORIN & CIE  
 <120> RÉSISTANCE DES MELONS AU VIRUS TOLCNDV  
 <130> B11542A CS  
 <150> EP 15307186.5  
 <151> 30-12-2015  
 <160> 26  
 <170> Version PatentIn 3.5  
 <210> 1  
 <211> 89  
 <212> ADN  
 <213> Cucumis melo  
 <220>  
 <221> polymorphisme  
 <222> (42)..(42)  
 <223> sensible = G ; résistant = T  
 <400> 1  
 aaccaaagta cctgttgggg ctctttcccg tcaatccggt ckggctccgc atgtgccaca 60  
 gctacaatgt ggcgtctggc caaacgggt 89  
 <210> 2  
 <211> 89  
 <212> ADN  
 <213> Cucumis melo  
 <220>  
 <221> polymorphisme  
 <222> (84)..(84)  
 <223> sensible = A ; résistant = G  
 <400> 2  
 aaccaaagta cctgttgggg ctctttcccg tcaatccggt cgggctccgc atgtgccaca 60  
 gctacaatgt ggcgtctggc caarccgggt 89  
 <210> 3  
 <211> 89  
 <212> ADN  
 <213> Cucumis melo  
 <220>  
 <221> polymorphisme  
 <222> (63)..(63)  
 <223> sensible = T ; résistant = A  
 <400> 3  
 ctttgtcgaa agcgtatgaa cgccgtgcga gtgaaattca atttatgaaa ccaataaatt 60  
 cawagaagaa taataaacat gcttctcat 89  
 <210> 4  
 <211> 89

## B11542AD\_B11542AD\_ SQL\_ST25 (version FR)

<212> ADN  
 <213> Cucumis melo

<220>  
 <221> polymorphisme  
 <222> (82)..(82)  
 <223> sensible = A ; résistant = C

<400> 4  
 ctttgtcgaa agcgtatgaa cgccgtgcga gtgaaattca atttatgaaa ccaataaatt 60  
 caaagaagaa taataaacat gmttctcat 89

<210> 5  
 <211> 89  
 <212> ADN  
 <213> Cucumis melo

<220>  
 <221> polymorphisme  
 <222> (17)..(17)  
 <223> sensible = G ; résistant = A

<400> 5  
 gacaaccaac tttaccrata accttcccga tctgcttgga gggcacaacg attctgaaaa 60  
 gcacgtcgtg ggccttcgct tgtctttta 89

<210> 6  
 <211> 89  
 <212> ADN  
 <213> Cucumis melo

<220>  
 <221> polymorphisme  
 <222> (74)..(74)  
 <223> sensible = G ; résistant = A

<400> 6  
 tatccctcca ctcgtctcat ttatgatgtc ctcctttggg tgtttggtg cacaacctat 60  
 gttcttagcc atgrtcctaa ccaaactaa 89

<210> 7  
 <211> 89  
 <212> ADN  
 <213> Cucumis melo

<220>  
 <221> polymorphisme  
 <222> (74)..(74)  
 <223> sensible = C ; résistant = T

<400> 7  
 ctcagataat caacctctgg tacgactggc ctaatggctg gaacttcaac atcatccaac 60  
 accagctcgg caaygttctc tacgacctc 89

<210> 8  
 <211> 89

B11542AD\_B11542AD\_ SQL\_ST25 (version FR)

<212> ADN  
<213> Cucumis melo

<220>  
<221> polymorphisme  
<222> (78)..(78)  
<223> sensible = A ; résistant = G

<400> 8  
aaccaacact gtttcttggtg aaaattgttt gggtgttata tctgtatgca gaggcctatt 60  
atgtggtgct ttgatggrtg gtttagaat 89

<210> 9  
<211> 89  
<212> ADN  
<213> Cucumis melo

<220>  
<221> polymorphisme  
<222> (58)..(58)  
<223> sensible = C ; résistant = A

<400> 9  
ggcctaaaa aatcgtagca ttatagagaa atgcaaaca gggtagaagg gtagaagmgc 60  
ttgccttgta caagaactcc gcatagtta 89

<210> 10  
<211> 89  
<212> ADN  
<213> Cucumis melo

<220>  
<221> polymorphisme  
<222> (27)..(27)  
<223> sensible = C ; résistant = G

<400> 10  
ccacctgaag acgtggagat ccaacgstcg agatcgaacc gtaacggcct cgccaaaatc 60  
caacggcaaa aaactagcga aagtggaag 89

<210> 11  
<211> 89  
<212> ADN  
<213> Cucumis melo

<220>  
<221> polymorphisme  
<222> (30)..(30)  
<223> sensible = A ; résistant = G

<400> 11  
ccacctgaag acgtggagat ccaacggctc agatcgaacc gtaacggcct cgccaaaatc 60  
caacggcaaa aaactagcga aagtggaag 89

<210> 12  
<211> 89

B11542AD\_B11542AD\_ SQL\_ST25 (version FR)

<212> ADN  
<213> Cucumis melo

<220>  
<221> polymorphisme  
<222> (36)..(36)  
<223> sensible = A ; résistant = G

<400> 12  
ccacctgaag acgtggagat ccaacggctg agatcraacc gtaacggcct cgccaaaatc 60  
caacggcaaa aaactagcga aagtggaag 89

<210> 13  
<211> 89  
<212> ADN  
<213> Cucumis melo

<220>  
<221> polymorphisme  
<222> (13)..(13)  
<223> sensible = T ; résistant = C

<400> 13  
tcgagccaaa gaytgaagat caccatcttc acccatctga tcttgataat caactgggtt 60  
cagaaagcta tttgtcattt cgttacaac 89

<210> 14  
<211> 89  
<212> ADN  
<213> Cucumis melo

<220>  
<221> polymorphisme  
<222> (45)..(45)  
<223> sensible = G ; résistant = C

<400> 14  
tggtgggatt tgaatccaag atgtctgtca gtgcttctc ttcasaccgc agggattgga 60  
caaaagccgg acagcgcggt gatgcgccg 89

<210> 15  
<211> 89  
<212> ADN  
<213> Cucumis melo

<220>  
<221> polymorphisme  
<222> (5)..(5)  
<223> sensible = C ; résistant = T

<400> 15  
ccagygtct tcgtcggcgg cggcgattga gtctacactc cggttttcaa ctccgacgca 60  
gggctgcaaa tttgattatc gagggaaaa 89

<210> 16  
<211> 89

B11542AD\_B11542AD\_ SQL\_ST25 (version FR)

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Cucumis melo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polymorphisme

&lt;222&gt; (17)..(17)

&lt;223&gt; sensible = G ; résistant = T

&lt;400&gt; 16

ccagcggctct tcgctcgkcg ggcgattga gtctacactc cggttttcaa ctccgacgca 60

gggctgcaaa ttgattatc gagggaaaa 89

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Cucumis melo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polymorphisme

&lt;222&gt; (86)..(86)

&lt;223&gt; sensible = C ; résistant = T

&lt;400&gt; 17

tcacgccgtg ttttcaacgc acaaattgaa tttccgacac cttatatta ttatcacctc 60

cactccccca ccgccgccgc ctctcycgc 89

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Cucumis melo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polymorphisme

&lt;222&gt; (5)..(5)

&lt;223&gt; sensible = G ; résistant = T

&lt;400&gt; 18

accgkcgact cattggtccg gcgacagagg agagagagag agattgatgc tcaagcgtgc 60

gagcatgcga ggggaagggg ttcgcacgc 89

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Cucumis melo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polymorphisme

&lt;222&gt; (5)..(5)

&lt;223&gt; sensible = G ; résistant = T

&lt;400&gt; 19

accgkcgact cattggtccg gcgacagagg agagagagag attgatgctc aagcgtgcga 60

gcatgcgagg ggaaggggtt .cgcacgcgc 89

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 89

B11542AD\_B11542AD\_ SQL\_ST25 (version FR)

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Cucumis melo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polymorphisme

&lt;222&gt; (34)..(34)

&lt;223&gt; sensible = A ; résistant = T

&lt;400&gt; 20

gaggcagtct tctcccatg tagacttcat tctwcccggtg gaatagatcg aatacgtaac 60

cgatgatccc gccggaacga aggttccgt 89

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Cucumis melo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polymorphisme

&lt;222&gt; (40)..(40)

&lt;223&gt; sensible = T ; résistant = A

&lt;400&gt; 21

gcacccgatt gatcttcaag acgtgttgtt acgtcttacw tttgataata tttgtggttt 60

ggcttttggga aaagatccaa tgacttgtg 89

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Cucumis melo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polymorphisme

&lt;222&gt; (11)..(11)

&lt;223&gt; sensible = T ; résistant = C

&lt;400&gt; 22

accggggcgg yggctttcag gacgttgaag gaaaatgaat ggaccaaacg agaacgacca 60

aagtgggtcg acgtccaaat cagcatttc 89

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Cucumis melo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polymorphisme

&lt;222&gt; (65)..(65)

&lt;223&gt; sensible = C ; résistant = G

&lt;400&gt; 23

ggagcaatgc gacgacgccg tcaccgtctg acgtggagga gttggattat gtggaagacg 60

atgasgacga tgaggaggag gaggacggc 89

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 89

B11542AD\_B11542AD\_ SQL\_ST25 (version FR)

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Cucumis melo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polymorphisme

&lt;222&gt; (24)..(24)

&lt;223&gt; sensible = A ; résistant = T

&lt;400&gt; 24

cacggctgca ttcctagcac catwggccaa atgtctaacc tcaaccaaat tctctttctc 60

ggcaacaagc tcggtggttg tttcccacc 89

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Cucumis melo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polymorphisme

&lt;222&gt; (49)..(49)

&lt;223&gt; sensible = G ; résistant = A

&lt;400&gt; 25

ttgtttggag agtctggctt gcggcgttcc aaccgtggcg tttccacart ggtccgatca 60

agcgaccaac actaatgatca ttcaggact 89

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Cucumis melo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; polymorphisme

&lt;222&gt; (72)..(72)

&lt;223&gt; sensible = C ; résistant = G

&lt;400&gt; 26

ttgtttggag agtctggctt gcggcgttcc aaccgtggcg tttccacagt ggtccgatca 60

agcgaccaac astaagatca ttcaggact 89

## REVENDEICATIONS :

1. Plante de *Cucumis melo* subsp. *melo* résistant au virus New Delhi des feuilles enroulées de la tomate (ToLCNDV), ayant dans son génome des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, conférant ladite résistance uniquement lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote, dans laquelle lesdites séquences introgressées sont situées sur les chromosomes homologues 11, dans la région chromosomique délimitée par le SNP Melon\_sbg\_617\_42 (SEQ ID N°1) et le SNP Melon\_sbg\_16835\_17 (SEQ ID N°16), de préférence dans la région chromosomique délimitée par le SNP Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7) et le SNP Melon\_sbg\_16835\_17 (SEQ ID N°16) et sont choisies parmi les séquences introgressées présentes dans le génome des graines *C. melo* résistantes, déposées auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB-42506, sur le chromosome 11, dans la région chromosomique délimitée par le SNP Melon\_sbg\_617\_42 (SEQ ID N°1) et le SNP Melon\_sbg\_16835\_17 (SEQ ID N°16), conférant ainsi la résistance.
2. Plante de *C. melo* subsp. *melo* selon la revendication 1, dans laquelle lesdites séquences introgressées sont situées sur les chromosomes homologues 11, dans la région chromosomique délimitée par le SNP Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7) et le SNP Melon\_sbg\_22016\_36 (SEQ ID N°12).
3. Plante selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, dans laquelle la présence desdites séquences introgressées sur le chromosome 11 et conférant ladite résistance, est caractérisée par au moins un marqueur sélectionné dans le groupe consistant en SNP Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7), SNP Melon\_sbg\_2720\_78 (SEQ ID N°8), SNP Melon\_sbg\_14207\_58 (SEQ ID N°9), SNP Melon\_sbg\_22016\_27 (SEQ ID N°10), SNP Melon\_sbg\_22016\_30 (SEQ ID N°11) et SNP Melon\_sbg\_22016\_36 (SEQ ID N°12), de préférence, par au moins 2 ou 5 marqueurs choisis dans ce groupe.
4. Plante selon la revendication 3, dans laquelle la présence desdites séquences introgressées est caractérisée par la présence de l'allèle T de SNP Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7), et / ou la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_2720\_78 (SEQ ID N°8) et / ou la présence de l'allèle A de SNP Melon\_sbg\_14207\_58 (SEQ ID N°9) et / ou la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_27 (SEQ ID N°10) et / ou la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_30 (SEQ ID N°11) et / ou la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_36 (SEQ ID N°12).
5. Plante selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle la présence desdites séquences introgressées sur chaque chromosome 11 se caractérise par :

- la présence de l'allèle T de SNP Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7) combinée à l'absence de l'allèle C pour ledit SNP ; et/ou
  - la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_2720\_78 (SEQ ID N°8) combinée à l'absence de l'allèle A pour ledit SNP ; et/ou
  - la présence de l'allèle A de SNP Melon\_sbg\_14207\_58 (SEQ ID N°9) combinée à l'absence de l'allèle C pour ledit SNP ; et/ou
  - la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_27 (SEQ ID N°10) combinée à l'absence de l'allèle C pour ledit SNP; et/ou
  - la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_30 (SEQ ID N°11) combinée à l'absence de l'allèle A pour ledit SNP ; et/ou
  - la présence de l'allèle G de Melon\_sbg\_22016\_36 (SEQ ID N°12) combinée à l'absence de l'allèle A pour ledit SNP.
6. Plante selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle ladite plante est un descendant ou est dérivé d'une semence déposée auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre 42506.
  7. Plante hybride de *Cucumis melo* subsp. *melo*, obtenue par croisement d'une plante résistant au ToLCNDV selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, avec une autre *C. melo* subsp. *melo*, de préférence, avec une plante sensible ou moins résistante.
  8. Plante selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans laquelle ladite plante peut porter des fruits de melons commercialisables.
  9. Plante selon la revendication 8, dans lequel un melon commercialisable possède une couleur de chair orangée, une forme de fruit ronde ou ronde-ovale et / ou une valeur brix d'au moins 9.
  10. Cellule d'une plante de *Cucumis melo* subsp. *melo* selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, comprenant dans son génome des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* sur le chromosome 11, dans laquelle lesdites séquences confèrent une résistance au ToLCNDV uniquement lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote, sont situées dans la région chromosomique délimitée par le SNP Melon\_sbg\_617\_42 (SEQ ID N°1) et le SNP Melon\_sbg\_16835\_17 (SEQ ID N°16) et sont choisies parmi les séquences introgressées présentes dans le génome des graines *C. melo* résistantes, déposées auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB-42506, sur le chromosome 11, dans la région chromosomique délimitée par le SNP Melon\_sbg\_617\_42 (SEQ ID N°1) et le SNP Melon\_sbg\_16835\_17 (SEQ ID N°16), conférant ainsi la

résistance.

11. Partie de plante, explant, scion, bouture, semence, fruit, racine, porte-greffe, pollen, ovule, embryon, silique, protoplaste, feuille, anthère, tige ou pétiole, d'une plante de *C. melo* subsp. *melo* ayant dans son génome des séquences introgressées conférant une résistance au ToLCNDV uniquement lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote, dans laquelle ladite (ledit) partie de plante, explant, scion, bouture, semence, fruit, racine, porte-greffe, pollen, ovule, embryon, silique, protoplaste, feuille, anthère, tige ou pétiole est obtenu(e) à partir d'une plante selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, et comprend des cellules, selon la revendication 10.
12. Semence d'une plante de *Cucumis melo* subsp. *melo*, donnant lieu, une fois cultivée, à une plante selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.
13. Culture tissulaire de cellules régénérables de la plante selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans laquelle les cellules régénérables dérivent d'embryons, de protoplastes, de cellules méristématiques, de cals, de pollen, de feuilles, d'anthères, de tiges, de pétioles, de racines, d'extrémités de racines, de silique, de semences, de fleurs, de cotylédons, et/ou d'hypocotyles, et contiennent, dans leur génome, des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* sur le chromosome 11 conférant une résistance au ToLCNDV, uniquement lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote, et dans laquelle les séquences introgressées sont situées dans la région chromosomique délimitée par le SNP Melon\_sbg\_617\_42 (SEQ ID N°1) et le SNP Melon\_sbg\_16835\_17 (SEQ ID N°16) et sont choisies parmi les séquences introgressées présentes dans le génome d'une graine *C. melo* résistante, déposée auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB-42506, sur le chromosome 11, dans la région chromosomique délimitée par le SNP Melon\_sbg\_617\_42 (SEQ ID N°1) et le SNP Melon\_sbg\_16835\_17 (SEQ ID N°16), conférant ainsi la résistance.
14. Semence, cellule ou plante selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans laquelle la présence desdites séquences introgressées sur le chromosome 11 se caractérise par :
  - la présence de l'allèle T de SNP Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7) et/ou
  - la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_2720\_78 (SEQ ID N°8) et/ou
  - la présence de l'allèle A de SNP Melon\_sbg\_14207\_58 (SEQ ID N°9) et/ou
  - la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_27 (SEQ ID N°10) et/ou
  - la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_30 (SEQ ID N°11) et/ou
  - la présence de l'allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_36 (SEQ ID N°12).

15. Méthode de détection et/ou de sélection de plantes de *C. melo* subsp. *melo* ayant des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, lesdites séquences introgressées conférant une résistance au ToLCNDV uniquement lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote, comprenant la détection d'au moins un des marqueurs suivants : allèle T de SNP Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7), et/ou allèle G de SNP Melon\_sbg\_2720\_78 (SEQ ID N°8) et/ou allèle A de SNP Melon\_sbg\_14207\_58 (SEQ ID N°9) et/ou allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_27 (SEQ ID N°10) et/ou allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_30 (SEQ ID N°11) et/ou allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_36 (SEQ ID N°12), dans un échantillon de matériel génétique de la plante à sélectionner.
  
16. Méthode de détection et/ou de sélection de plantes de *C. melo* subsp. *melo* ayant des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous* telles que présentes dans le génome d'une plante ToLR1 (numéro d'ordre NCIMB-42506), dans un programme de sélection, utilisant comme partenaire d'introgession ToLR1 ou sa descendance comprenant les séquences introgressées, dans laquelle la détection et/ou sélection est effectuée dans des conditions d'infection par le ToLCNDV, et dans laquelle les séquences introgressées confèrent une résistance au ToLCNDV uniquement lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote, et sont caractérisées par au moins l'un des marqueurs suivants : allèle T de SNP Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7), et/ou allèle G de SNP Melon\_sbg\_2720\_78 (SEQ ID N°8) et/ou allèle A de SNP Melon\_sbg\_14207\_58 (SEQ ID N°9) et/ou allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_27 (SEQ ID N°10) et/ou allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_30 (SEQ ID N°11) et/ou allèle G de SNP Melon\_sbg\_22016\_36 (SEQ ID N°12).
  
17. Utilisation de plantes de *C. melo* subsp. *melo* ayant des séquences introgressées de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulous*, lesdites séquences introgressées conférant une résistance au ToLCNDV uniquement lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote, pour restreindre la croissance et le développement du ToLCNDV, dans laquelle les séquences introgressées sont présentes sur les chromosomes 11, dans la région chromosomique délimitée par le SNP Melon\_sbg\_617\_42 (SEQ ID N°1) et le SNP Melon\_sbg\_16835\_17 (SEQ ID N°16), de préférence dans la région chromosomique délimitée par le SNP Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7) et le SNP Melon\_sbg\_16835\_17 (SEQ ID N°16), et sont choisies parmi les séquences introgressées présentes dans le génome d'une graine *C. melo* résistante, déposée auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB-42506, sur le chromosome 11 et conférant la résistance.

18. Méthode pour lutter contre le ToLCNDV, comprenant la culture de plantes résistantes audit virus, dans laquelle lesdites plantes sont des plantes *C. melo* subsp. *melo* ayant dans leur génome des séquences introgressées conférant ladite résistance au ToLCNDV uniquement lorsqu'elles sont présentes à l'état homozygote, dans laquelle les séquences introgressées sont présentes sur les chromosomes 11, dans la région chromosomique délimitée par le SNP Melon\_sbg\_617\_42 (SEQ ID N°1) et le SNP Melon\_sbg\_16835\_17 (SEQ ID N°16), de préférence dans la région chromosomique délimitée par le SNP Melon\_sbg\_33761\_74 (SEQ ID N°7) et le SNP Melon\_sbg\_16835\_17 (SEQ ID N°16), et sont choisies parmi les séquences introgressées présentes dans le génome d'une semence de ToLR1 résistante, déposée auprès de la NCIMB sous le numéro d'ordre NCIMB-42506, sur le chromosome 11 et conférant la résistance.

1/3

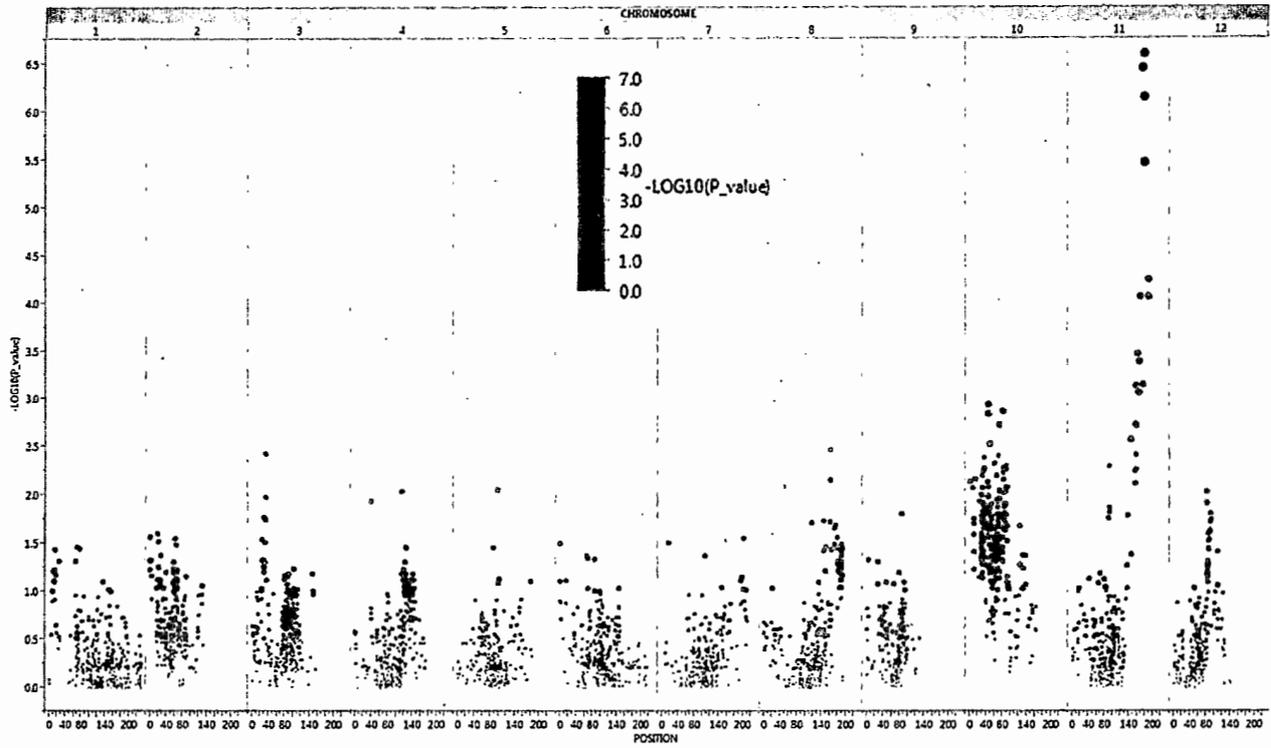


FIG. 1

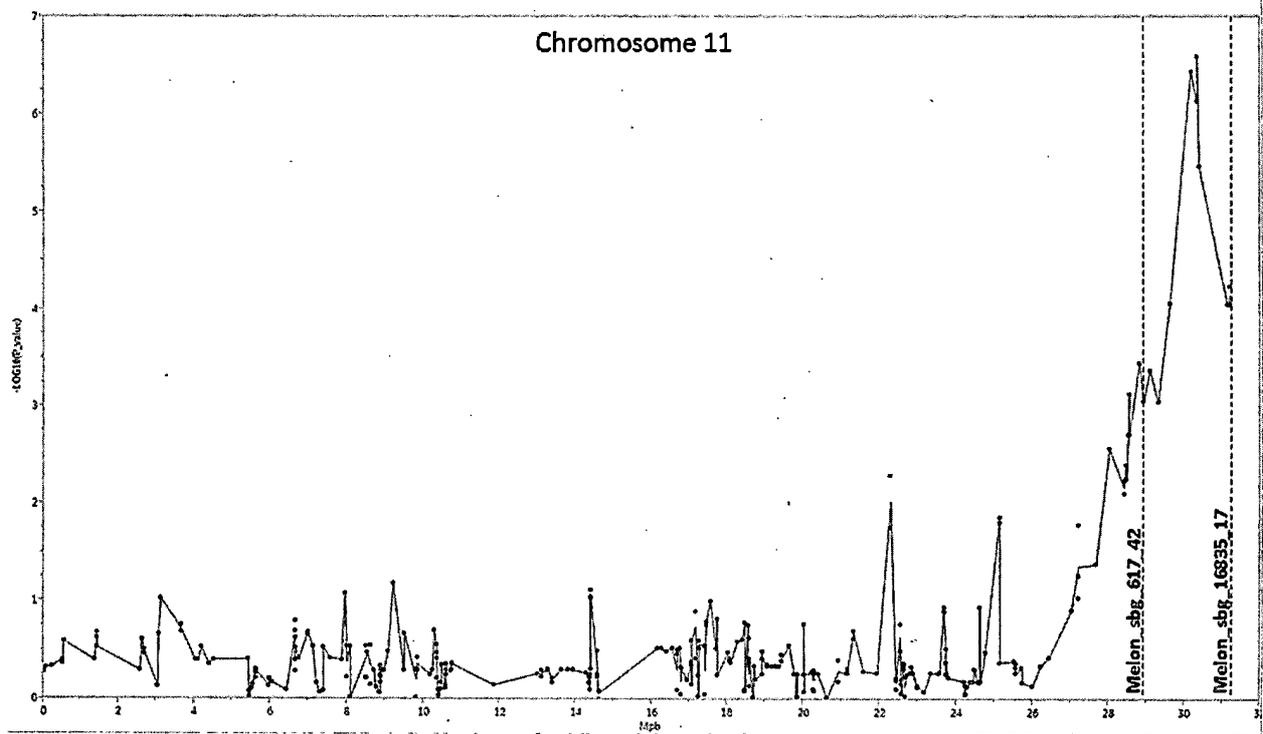


FIG. 2

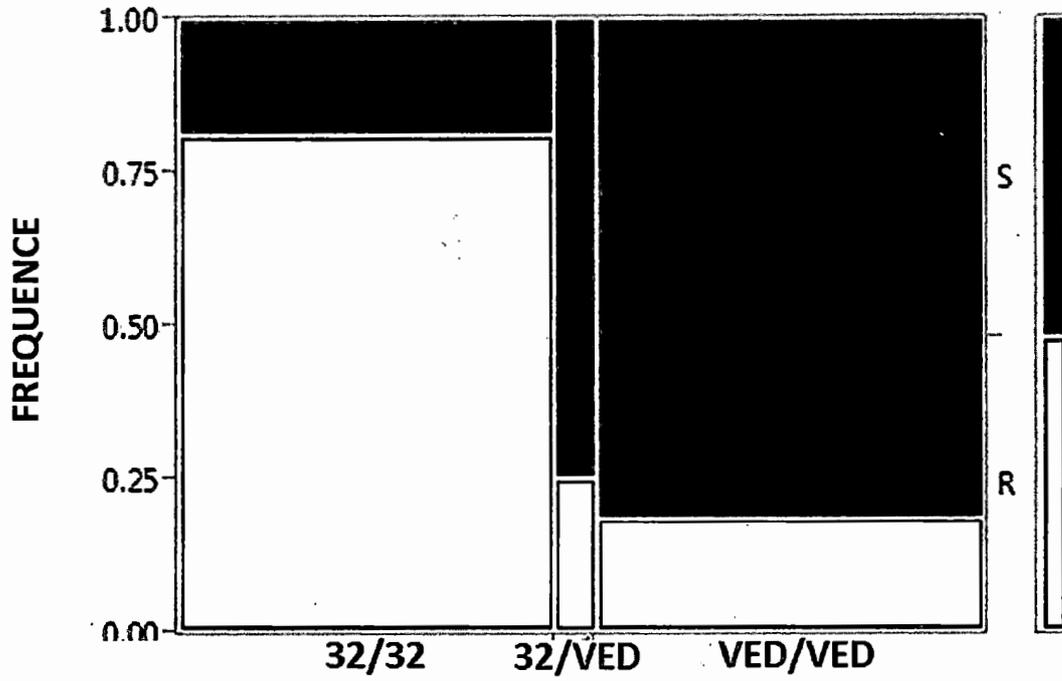


FIG. 3

1/3

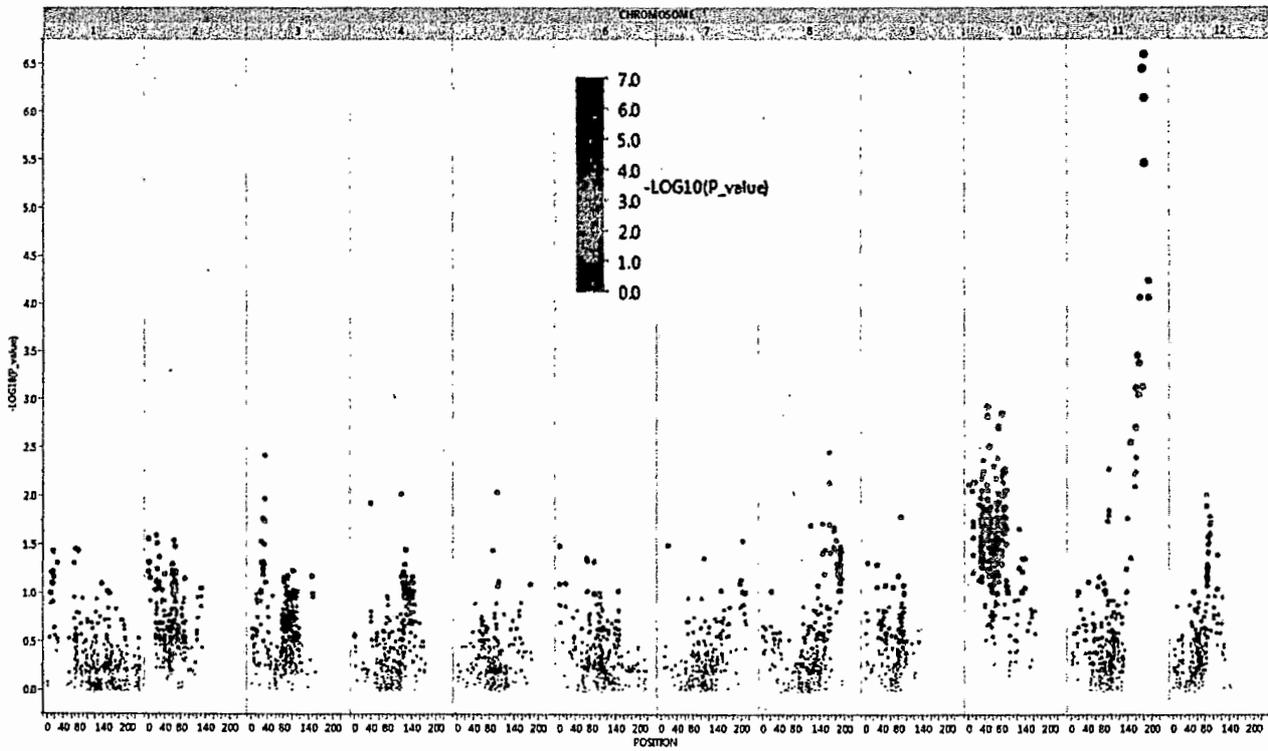


FIG. 1

2/3

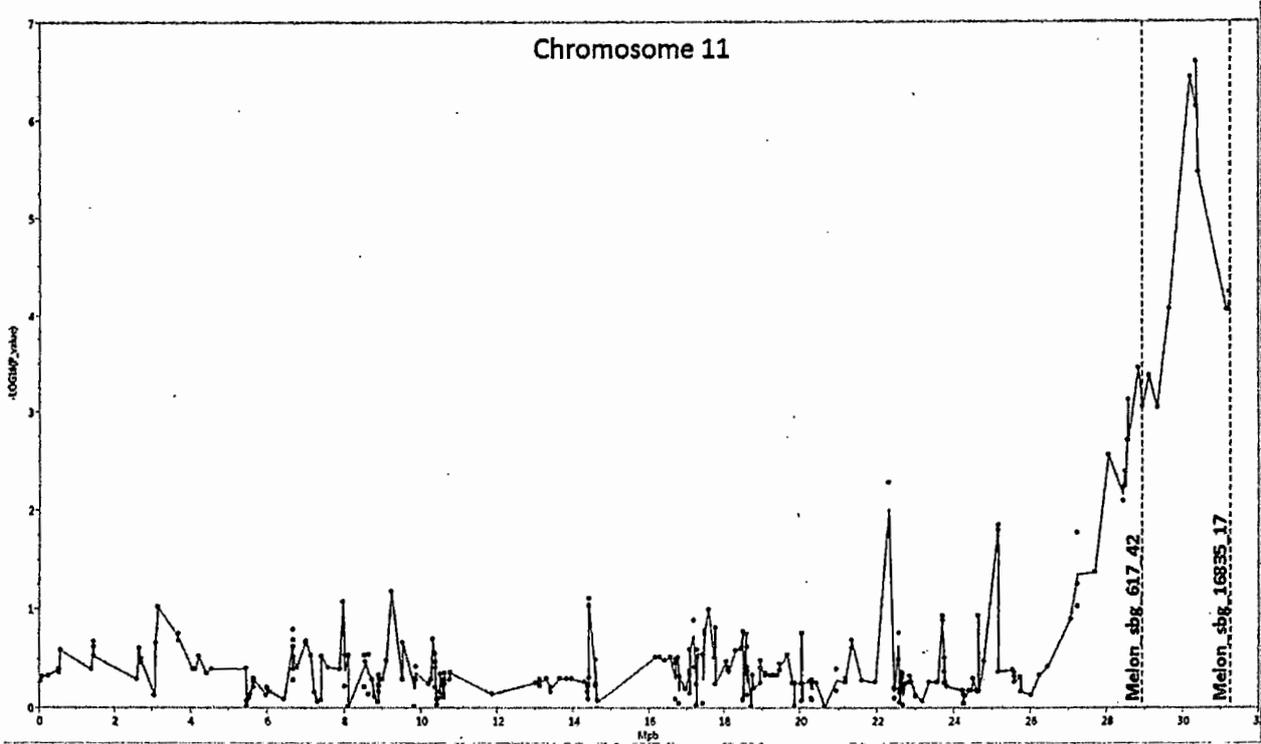


FIG. 2

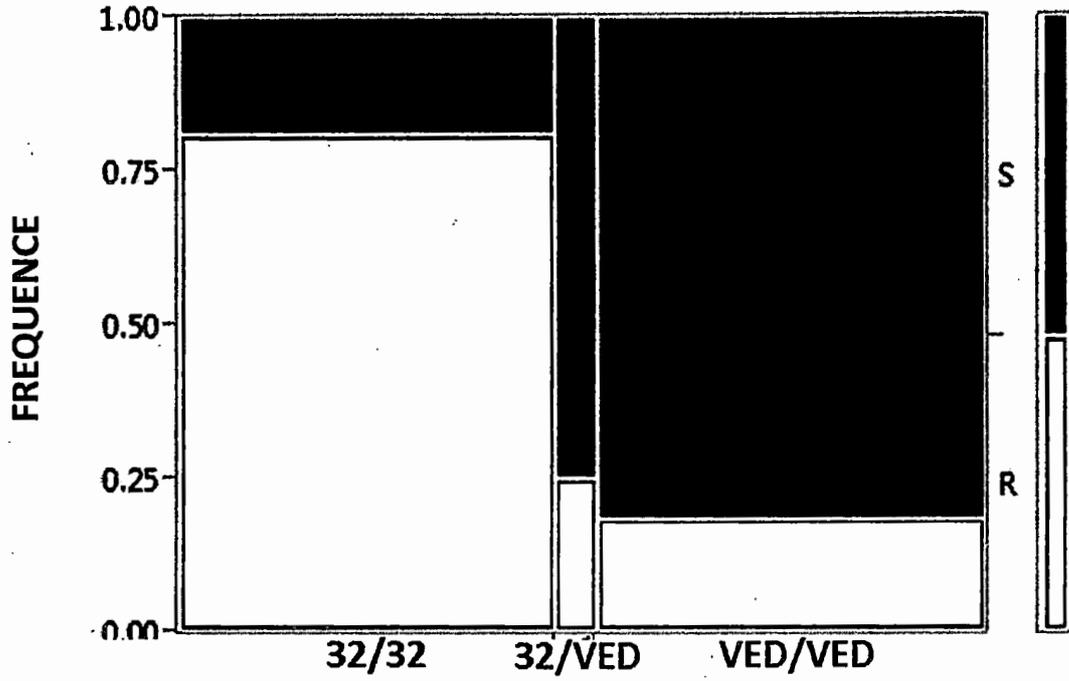


FIG. 3

## RAPPORT DE RECHERCHE DEFINITIF AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE

Établi conformément à l'article 43.2 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13

| Renseignements relatifs à la demande   |  |
|--|--|
| N° de la demande : 42754   | Date de dépôt : 28/12/2016   |
|  | Date d'entrée en phase nationale : 27/06/2018  |
| Déposant : VILMORIN & CIE  | Date de priorité: 30/12/2015   |
| Intitulé de l'invention : RÉSISTANCE AU VIRUS TOLCNDV DU MELON   |  |
| <b>Classement de l'objet de la demande :</b><br>CIB : A01H1/04, A01H5/10, C12Q1/68<br>CPC: A01H1/04; A01H5/08; C12Q1/6895  |  |
| Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :<br><br>Partie 1 : Considérations générales<br><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport<br><input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité<br><br>Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité<br><input type="checkbox"/> Cadre 3 : Remarques de clarté<br><input type="checkbox"/> Cadre 4 : Observations à propos de revendications modifiées qui s'étendent au-delà du contenu de la demande telle qu'initialement déposée<br><input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention<br><input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité<br><input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle |  |
| Examineur: Redouane TELLAA   | Date d'établissement du rapport : 19/10/2022<br> |
| Téléphone: (+212) 5 22 58 64 14  |  |

**Partie 1 : Considérations générales****Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Demande telle qu'initialement déposée
- Demande modifiée suite à la notification du rapport de recherche préliminaire :
- Observations à l'appui des revendications maintenues
- Observations des tiers suite à la publication de la demande
- Réponses du déposant aux observations des tiers
- Nouveaux documents constituant des antériorités :
- Suite à la recherche complémentaire (Couvrant les documents de l'état de la technique qui n'étaient pas disponibles à la date de la recherche préliminaire)
  - Suite à la recherche additionnelle (couvrant les éléments n'ayant pas fait l'objet de la recherche préliminaire)
- Observations à l'encontre de la décision de rejet
- Revendications  
18

**Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité****Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

|                          |                       |     |
|--------------------------|-----------------------|-----|
| Nouveauté                | Revendications 1 - 18 | Oui |
|                          | Revendications aucune | Non |
| Activité inventive       | Revendications 1 - 18 | Oui |
|                          | Revendications aucune | Non |
| Application Industrielle | Revendications 1 - 18 | Oui |
|                          | Revendications aucune | Non |

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1 : New Dis. Rep. 28:17  
D3 : Euphytica 204:679-691

**1. Nouveauté**

Aucun document de l'art antérieur ne décrit une plante Cucumis melo subsp. melo qui résiste au virus de New Delhi des feuilles enroulées de tomate (ToLCNDV) introgressées par un C. melo subsp. agrestis var. acidulous telle que décrite dans la revendication 1 de la présente

demande.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-18 est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

## **2. Activité inventive**

Le Document D1 est considéré comme l'art antérieur le plus proche de l'objet de la revendication 1 de la présente demande. Il décrit des plantes de *C. melo* qui sont sensibles au ToLCNDV.

L'objet de la revendication 1 de la présente demande diffère de D1 en ce que d'autres plantes de *C. melo* résistantes au ToLCNDV sont revendiquées.

Le problème technique que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme la fourniture d'une plante *C. melo* résistante au ToLCNDV.

La solution proposée dans la revendication 1 de la présente demande implique une activité inventive pour les raisons suivantes :

D3 divulgue que les 2 accessions de *Cucumis melo* subsp. *agrestis* var. *acidulés* ne sont pas tolérants, contrairement à certaines accessions, plus précisément 3 accessions indiennes de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *momordica* et 2 accessions indiennes de type sauvage *C. melo* subsp. *agrestis*.

vu les enseignements de D3, l'homme du métier aurait choisi les accessions indiennes de *C. melo* subsp. *agrestis* var. *momordica* ou, l'accession indienne de type sauvage *C. melo* subsp. *agrestis* en vue de sélectionner des melons tolérants. L'homme du métier n'aurait pas envisagé d'utiliser l'accession *C. melo* subsp. *agrestis* var. *acidulés* qui est révélée comme sensible en D3.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-18 implique une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

## **3. Application industrielle**

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.