



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 273**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**A01H 5/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05700744 .5**  
96 Fecha de presentación : **07.01.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1587933**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54 Título: **Nuevas plantas de melón.**

30 Prioridad: **09.01.2004 US 535631 P**  
**27.02.2004 ES 200400473**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2009**

73 Titular/es: **Syngenta Participations AG.**  
**Schwarzwaldallee 215**  
**4058 Basel, CH**

72 Inventor/es: **Álvarez Casanueva, José I.;**  
**Foncelle, Bruno;**  
**Nicolet, Jean-Louis Marie E.;**  
**Van Doorn, Johannes Elisabert y**  
**Olivier, Seros Marc**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 313 273 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nuevas plantas de melón.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevas plantas, en particular plantas de melón capaces de producir frutos con un nuevo sabor agradable. En particular, los frutos de las plantas de melón de la presente invención tienen contenidos alterados de ácidos orgánicos, pH más bajo cuando se comparan con los frutos de melón dulce comerciales, y altos contenidos de azúcares.

**Antecedentes de la invención**

El melón (*Cucumis melo* L.) es un cultivo comercial desarrollado en todo el mundo. *Cucumis melo* es un miembro de la familia Cucurbitáceas. Las Cucurbitáceas comprenden aproximadamente 90 géneros y 700 a 760 especies, en su mayoría de los trópicos. La familia incluye calabacines, calabazas, güiros, sandías, lufas, y varias malas hierbas. *Cucumis melo* L. incluye una diversidad muy amplia de cultivares que producen frutos de forma, aspecto exterior y color de la pulpa diferentes. Los melones comerciales producen generalmente frutos dulces conocidos, por ejemplo, como Charentais, Cantaloupe, Honeydew, Amarelo, Piel de Sapo, Kirkagak, Hamy, Ananas, Galia y Oriental, que se consumen usualmente como frutas de postre. *Cucumis melo* L. incluye también cultivares comerciales no dulces consumidos en el Oriente Medio hasta el Extremo Oriente en ensalada, cocinados o en forma de encurtido, como por ejemplo Alficoz, Faqqous, Chito, Conomon (Pitrat *et al.* (2000) Eucarpia Meeting Proceedings: 29-36). El sabor y aroma de los frutos de melón están determinados por varios factores, que incluyen azúcares, componentes volátiles aromáticos, aminoácidos libres, ácidos orgánicos, pH y minerales solubles (Wang *et al.* (1996) J. Agric. Food Chem. 44:210-216). Entre los cuatro sabores primarios (dulce, agrio, amargo, salado), se considera que el dulce es un componente muy importante de los frutos de melón con buen sabor. En los frutos de melón comerciales, el sabor dulce es el resultado en la mayoría de los casos de niveles elevados de sacarosa (Burger *et al.* (2002) J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127 (6):938-943). La sacarosa se acumula al final del desarrollo del fruto, durante el proceso de maduración (Shaffer *et al.* (1987) Phytochemistry 26:1883-1887). Los frutos de melón acumulan también inicialmente hexosas, principalmente fructosa y glucosa, que son los azúcares reductores dominantes (Stepanski *et al.* (1999) Genetic Resources and Crop Evolution 46:53-62). Un componente de sabor importante en los frutos de melón es el dulce, que es principalmente el resultado de la acumulación de azúcares. El dulce está correlacionado no sólo con el contenido total de azúcares, sino también con el tipo de azúcares. Por ejemplo, 1 gramo de glucosa es el dulce equivalente a 0,7 gramos de sacarosa; 1 gramo de fructosa es el equivalente de dulce de 1,7 gramos de sacarosa; 1 gramo de azúcar invertido, es decir glucosa más fructosa generadas a partir de 1 gramo de sacarosa, es el equivalente de dulce de 1,3 gramos de sacarosa (J.A. BABOR y J. IBARZ (1935) Química General Moderna).

La pulpa de los frutos de melón dulce tiene un pH usualmente superior a 6,0, pero se conocen también accesos de melón que tienen un pH mucho menor, tan bajo como inferior a 5,0. Este bajo pH está extendido en muchos tipos diferentes de melón como por ejemplo Faqqous, Chito, Conomon, Momordica, Agrestis (Stepanski *et al.*). En la mayoría de estos casos, estos tipos de melón combinan pH bajo y contenido bajo de azúcar, v.g. sacarosa (Stepanski *et al.*). Estos frutos no son comestibles generalmente en consumo fresco sin aderezo o cocinado y, en algunos casos, son incluso amargos. En la mayoría de estos accesos de melón con bajo pH, el mesocarpio, que es la parte comestible del fruto, representa una parte comparativamente menor del fruto total, mientras que la cavidad de las semillas y la placenta representan una parte principal del peso total en fresco del fruto. Esto está en contraposición con los melones dulces de postre, en los cuales el mesocarpio representa una parte principal del fruto. Asimismo, en muchos casos, el tamaño o peso del fruto del melón que tiene pH bajo es inferior a los intervalos aceptables comercialmente.

La pulpa del fruto de algunos melones tiene un sabor agrio (Kubicki (1962) Genetica Polonica 3:265-274). La causa del sabor agrio no está aclarada todavía, pero se ha relacionado con el pH bajo en la pulpa del fruto (documento US 5.476.998 y Danin-Poleg *et al.* (2002) Euphytica 125:373-384). Han sido consignados también genes individuales para sabor agrio (*So*) y pH, aunque su asociación genética no está clara (Danin-Poleg *et al.*).

Se han hecho tentativas de producir frutos de melón que combinan sabores agrio y dulce. Por ejemplo, se han consignado los melones Najd, basados en variedades salvajes de Arabia (Ibrahim y Al-Zeir (1992) Hort Science 27:276-277). El documento US 5.476.998 describía también melones con un sabor agrio, con un valor medio de pH de 4,8 y un contenido soluble total de aproximadamente 11. Los melones citados en el documento US 5.476.998 se derivan de MR-1, conocido también como PI124111 (Thomas, Eucarpia'92 pp 142), que es un *C. melo* Var. Momordica (Roxburg). Los frutos de este melón exhibían pH bajo (Danin-Poleg *et al.*). Esta variedad de melón implica también características deficientes de fruto tales como pulpa muy harinosa, no aromática y no dulce, comportamiento muy crítico y estallido de la piel delgada en la maduración. Estos rasgos indeseables son difíciles de eliminar por mejora genética y se espera por tanto que el desarrollo de productos comerciales a partir de una variedad de este tipo sea laborioso y difícil. De acuerdo con ello, existe una necesidad insatisfecha de melones que produzcan frutos con sabores alternativos o mejorados. En particular, existe una necesidad insatisfecha de frutos de melón que tengan nuevas combinaciones de características organolépticas y aroma.

**Sumario de la invención**

La presente invención aborda la necesidad de frutos de melón con sabores alternativos o mejorados. De acuerdo con ello, la presente invención describe plantas de melón capaces de producir frutos con nuevas combinaciones de contenidos y composiciones de ácidos orgánicos, pH, y contenidos y composiciones de azúcares. La invención describe también métodos de producción y métodos de utilización de las plantas de la presente invención y sus frutos.

Los autores de la presente solicitud de patente han identificado que existe una gran variabilidad en los contenidos y composición de ácidos orgánicos en los frutos de melón. En particular, los autores de la presente invención han identificado que las plantas de melón producen frutos con contenidos variables de ácido cítrico y relaciones variables de ácido cítrico a ácido málico. De acuerdo con ello, los autores de la presente invención han combinado contenido apropiado de ácidos orgánicos, pH bajo y contenidos de azúcar deseados en un fruto de melón para obtener sabores nuevos y extremadamente agradables.

De acuerdo con ello, en un aspecto, la presente invención describe plantas de melón capaces de producir fruto con pH bajo y combinaciones deseadas de contenidos de ácidos cítrico y málico, al tiempo que se mantienen o se incrementan los niveles de azúcares observados corrientemente en los melones dulces. En un aspecto, la presente invención describe plantas de melón capaces de producir fruto con pH bajo y combinaciones deseadas de contenidos de ácido cítrico y ácido málico, combinados con combinaciones deseadas de contenidos de sacarosa y hexosas. En una realización, la presente invención proporciona plantas de melón capaces de producir frutos con contenidos elevados de ácido cítrico y pH inferior, cuando se comparan con los melones comerciales actuales que comprenden en la madurez:

- a) aproximadamente 400 mg a aproximadamente 1200 mg de ácido cítrico por 100 g de peso fresco (pf);
- b) pH de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 5,6; y
- c) aproximadamente 5,0 g a aproximadamente 15,0 g de azúcar por 100 g de pf,

en donde la relación de ácido cítrico a ácido málico en dicho fruto es mayor que 5.

En una realización, el contenido de ácido cítrico de un fruto de una planta de acuerdo con la presente invención es aproximadamente 400 mg a aproximadamente 1000 mg de ácido cítrico por 100 g de pf. En una realización, las plantas de melón de la presente invención producen frutos comestibles, preferiblemente con una forma redonda u ovalada, y que pesan preferentemente más de 450 gramos. La pulpa de los melones de la presente invención es preferiblemente verde, amarilla, blanca o anaranjada.

En una realización, las plantas de melón de la presente invención se obtienen por introducción de un rasgo de pH bajo en una planta de melón que no comprende dicho rasgo. En una realización, las plantas de melón de la presente invención se obtienen por introducción de un gen de pH bajo en una planta de melón que no comprende dicho gen. En una realización, el gen del pH bajo puede obtenerse de la línea IND-35, depositada con NCIMB bajo el Número de Acceso NCIMB 41202. De acuerdo con ello, la presente invención describe plantas de melón que comprenden un rasgo de pH bajo, y que producen fruto que comprende contenidos y composiciones deseados de ácidos orgánicos, pH y contenidos y composiciones de azúcares. Se alcanzan contenidos incrementados de ácido cítrico al tiempo que se mantienen niveles bajos de ácido málico en el fruto. En una realización, los frutos de la planta de melón de la presente invención tienen una relación de ácido cítrico a ácido málico mayor que 5.

En una realización, las plantas de melón de la presente invención son capaces de producir fruto con contenido de ácido cítrico igual o mayor que aproximadamente 400 mg por 100 g de peso fresco (pf). En una realización, las plantas de melón de la presente invención son capaces de producir fruto con un pH de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 5,6. En una realización, las plantas de melón de la presente invención son capaces de producir fruto con un contenido de azúcares igual o mayor que aproximadamente 5,0 g por 100 g de pf. En una realización, las plantas de melón de la presente invención son capaces de producir fruto con un contenido de azúcar igual o mayor que aproximadamente 7,0 g por 100 g de pf.

En una realización, la presente invención describe plantas de melón capaces de producir fruto con contenido de ácido cítrico igual o mayor que aproximadamente 400 mg por 100 g de pf, pH de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 5,6, y contenido de azúcares igual o mayor que aproximadamente 5,0 g por 100 g de pf.

La presente invención describe plantas de melón capaces de producir un fruto jugoso muy dulce con sabor agrio refrescante ácido, a las que se hace referencia en esta memoria como plantas o frutos "Cítrico +". Tales frutos comprenden contenidos elevados de ácido cítrico y pH bajo, aumentando el sabor ácido y proporcionando una sensación ácido, que oculta los sabores todavía demasiado sosos y pobres de los frutos maduros tempranos.

En una realización, un fruto de una planta Cítrico + de la presente invención comprende en la madurez:

- a) aproximadamente 600 mg a aproximadamente 1200 mg de ácido cítrico por 100 g de pf;

## ES 2 313 273 T3

- b) pH de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 5,1; y
- c) aproximadamente 5,0 g a aproximadamente 15,0 g de azúcar por 100 g de pf.

5

En una realización, el contenido de ácido cítrico de un fruto de una planta de acuerdo con la presente invención es aproximadamente 600 mg a aproximadamente 1000 mg de ácido cítrico por 100 g de pf.

10 La presente invención describe adicionalmente una planta de melón capaz de producir un fruto dulce y aromático con sabor agrio frutal suave, al que se hace referencia en esta memoria como planta o fruto de melón "Cítrico -". Tales frutos comprenden contenidos relativamente altos de ácido cítrico y pH moderadamente bajo. Este pH moderadamente bajo produce una sensación frutal agria, que oculta otros sabores todavía demasiado sosos y pobres de los frutos de maduración temprana.

15 El fruto de una planta Cítrico - en la madurez comprende:

- a) aproximadamente 400 a aproximadamente 650 mg de ácido cítrico por 100 g de pf;
- b) pH de aproximadamente 4,6 a aproximadamente 5,6; y
- c) aproximadamente 5,0 g a aproximadamente 15,0 g de azúcar por 100 g de pf.

20

25 En una realización, la presente invención describe una planta de melón capaz de producir fruto con pH bajo y una pulpa de color anaranjado intenso. En una realización, la presente invención describe una planta de *C. melo* capaz de producir fruto con pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,6, en donde dicho fruto tiene una pulpa anaranjada clasificada como 4 o superior.

30 Las características de los frutos de melón descritas en esta memoria se miden sobre frutos de plantas de melón cultivadas en campos abiertos o en invernaderos, y cosechados en la madurez. En un aspecto de esta invención, los frutos se recolectan desde la madurez temprana a la madurez tardía (etapas 2-4, como se describen en esta memoria). En un aspecto, un fruto se encuentra en la madurez cuando sus contenidos de sacarosa son iguales o mayores que 2 g de sacarosa por 100 g de pf.

35 En un aspecto, se describe una planta de *C. melo* que es capaz de producir fruto que comprende un sabor ácido de aproximadamente 1,6 a aproximadamente 3,8 y un sabor de azúcar de aproximadamente 4,3 a aproximadamente 5,8. En un aspecto, se describe una planta de *C. melo* que es capaz de producir fruto que comprende un sabor ácido de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,8 y un sabor de azúcar de aproximadamente 4,3 a aproximadamente 5,6. En un aspecto, se describe una planta de *C. melo* que es capaz de producir fruto que comprende un sabor ácido de aproximadamente 1,6 a aproximadamente 3,0 y un sabor de azúcar de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 5,8. En una realización, el sabor ácido y el sabor de azúcar son determinados por un panel de Expertos, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 12 de esta memoria. En una realización, un fruto de este tipo comprende un pH y un contenido de ácido cítrico como se describen y reivindican en esta memoria. En una realización, un fruto de este tipo comprende un pH, contenidos y composiciones de ácidos orgánicos y contenidos y composiciones de azúcares como se describen y reivindican en esta memoria.

45

La presente invención describe una planta de *C. melo* que comprende una secuencia de DNA, que se segrega juntamente con un rasgo de pH bajo. La secuencia de DNA es un molde para amplificación de un fragmento de DNA descrito en esta memoria utilizando los iniciadores descritos en esta memoria. La presente invención describe tales iniciadores y fragmentos de DNA amplificados utilizando estos iniciadores. Un fragmento de DNA descrito en esta memoria puede amplificarse a partir de DNA de dicha planta utilizando los iniciadores descritos en esta memoria. Los fragmentos de DNA se utilizan como marcadores moleculares para un rasgo de pH bajo. Un fragmento de DNA de aproximadamente 168 pb a aproximadamente 178 pb se amplifica a partir del DNA de dicha planta cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador CMAT141. En un caso, se amplifica un fragmento de DNA de 168 pb, 173 pb, 169 pb, 172 pb ó 178 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador CMAT141. En un caso, se amplifica un fragmento de DNA menor que 176 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador CMAT141.

50

55

En un caso, se amplifica un fragmento inferior a 275 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador CMAT141. En un caso, se amplifica un fragmento de DNA de aproximadamente 218 pb a aproximadamente 253 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador NE0585. En un caso, se amplifica un fragmento de DNA de 230 pb, 232 pb, 218 pb, 229 pb, 234 pb ó 239 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador NE0585. En un caso, se amplifica un fragmento de DNA de aproximadamente 121 pb a aproximadamente 145 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador NE1746. En un caso, se amplifica un fragmento de DNA de 124 pb, 127 pb, 133 pb, 142 pb o 145 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador NE1746.

65

## ES 2 313 273 T3

La presente invención describe una planta de *C. melo* que comprende una secuencia de DNA, que es un molde para la amplificación de un fragmento de DNA indicativo de la presencia de un rasgo de pH bajo en dicha planta (fragmento ácido) o de la ausencia del rasgo de pH bajo (fragmento básico) en dicha planta. La presente invención describe adicionalmente una planta de *C. melo* que comprende una secuencia de DNA, que es un molde para la amplificación de un fragmento básico ligado a un rasgo de pH bajo, en donde dicha secuencia de DNA está enlazada a dicho rasgo de pH bajo. La planta de *C. melo* puede comprender una secuencia de DNA de este tipo en un lado de un gen de pH bajo o en ambos lados de un gen de pH bajo. En una realización, un fruto de una planta de este tipo comprende un pH dentro de los intervalos descritos y reivindicados en esta memoria. En una realización, los frutos de una planta de este tipo comprenden los contenidos y composiciones de azúcares que se describen y reivindican en esta memoria. En una realización, los frutos de una planta de este tipo comprenden los contenidos y composiciones de ácidos orgánicos que se describen y reivindican en esta memoria. En una realización, los frutos de una planta de este tipo comprenden el pH, los contenidos y composiciones de azúcares y contenidos y composiciones de ácidos orgánicos que se describen y reivindican en esta memoria.

En un aspecto, se describe un fruto en el que las características de dicho fruto se mantienen estables después que el fruto alcanza la madurez. En un aspecto, tales características se mantienen estables después que el fruto alcanza la madurez cuando el fruto se deja en la planta. En un aspecto, tales características se mantienen estables cuando el fruto se recolecta y se guarda en almacenamiento después de la cosecha. Esto permite una frecuencia de cosecha reducida, y almacenar o transportar un fruto sin pérdida de sus características organolépticas y su aroma. En un aspecto, se describe un fruto, cuyo pH se mantiene estable después que el fruto alcanza la madurez. En un aspecto, se describe un fruto cuyo contenido de ácido cítrico se mantiene estable después que el fruto alcanza la madurez. En un aspecto, se describe un fruto cuyo contenido de ácido málico se mantiene estable después que el fruto alcanza la madurez. En un aspecto, se describe un fruto cuya relación de ácido cítrico a ácido málico se mantiene estable después que el fruto alcanza la madurez. En un aspecto, se describe un fruto cuyos pH y contenidos y composiciones de ácidos orgánicos se mantienen estables después que el fruto alcanza la madurez. Tales características se mantienen dentro de los intervalos descritos en esta memoria después que un fruto alcanza la madurez. En un aspecto, se describe una planta capaz de producir un fruto, cuyas características se mantienen estables durante al menos 2 días cuando el fruto se deja en la planta, en una realización durante al menos 3 días cuando el fruto se deja en la planta, en particular durante al menos 4 días cuando el fruto se deja en la planta. En un aspecto, se describe una planta capaz de producir un fruto, cuyas características se mantienen estables durante al menos 5 días cuando el fruto se guarda en almacenamiento a 20°C, en particular durante al menos 7 días cuando se guarda en almacenamiento a 20°C, en particular durante al menos 9 días cuando se guarda en almacenamiento a 20°C. En un aspecto, se describe una planta capaz de producir un fruto, cuyas características se mantienen estables durante al menos 7 días cuando se mantienen en almacenamiento a 8-12°C, seguidos por al menos 2 días a 20°C, en particular durante al menos 12 días cuando se guardan en almacenamiento a 8-12°C seguido por al menos 2 días a 20°C, en particular durante al menos 26 días cuando se guarda en almacenamiento a 8-12°C seguido por al menos 2 días a 20°C. En un aspecto, se describe una planta capaz de producir un fruto que tiene una vida útil larga (LSL) o un fruto de vida útil media (MSL). En una realización, una planta de la presente invención es capaz de producir un fruto no cambiante o un fruto poco cambiante. En una realización, una planta de la presente invención es capaz de producir un fruto no climatérico o un fruto poco climatérico.

La presente invención se refiere adicionalmente a semillas de una planta de *C. melo* de la presente invención, y semillas de la progenie de la misma, en donde dicha semilla de progenie es capaz de producir una planta de la presente invención. La presente invención describe adicionalmente partes de una planta de *C. melo* de la presente invención, v.g. óvulos o polen, y frutos de una planta de *C. melo* de la presente invención. La presente invención se refiere adicionalmente a la pulpa de un fruto de una planta de *C. melo* de la presente invención. La presente invención describe adicionalmente el zumo de un fruto de una planta de *C. melo* de la presente invención.

La presente invención se refiere adicionalmente al uso de la pulpa de un fruto de acuerdo con la presente invención en un producto cortado fresco. La presente invención describe adicionalmente el uso del zumo de un fruto de acuerdo con la presente invención en una bebida no alcohólica.

La presente invención describe adicionalmente métodos para aumentar el contenido de ácido cítrico de una planta que comprende obtener una primera planta de *C. melo*; cruzar dicha primera planta de *C. melo* con una segunda planta de *C. melo* que comprende un rasgo de pH bajo, obtener una planta de progenie de *C. melo*, determinar el pH y el contenido de ácido cítrico de un fruto de dicha planta de progenie, seleccionar un fruto de dicha planta de progenie de *C. melo* que tiene un contenido incrementado de ácido cítrico, cuando se compara con un fruto de dicha primera planta de *C. melo*. En una realización, dicha planta de progenie de *C. melo* tiene un pH más bajo cuando se compara con un fruto de dicha primera planta de *C. melo*. En un aspecto, se describe un método que comprende detectar un fragmento de DNA descrito en esta memoria utilizando los iniciadores descritos en esta memoria.

La presente invención describe adicionalmente el uso de una planta de melón que comprende un rasgo de pH bajo para obtener una planta de melón de la presente invención. La planta de melón de acuerdo con la invención que comprende un rasgo de pH bajo tiene adicionalmente la facultad de acumular niveles relevantes de azúcares, por ejemplo sacarosa, y acumular niveles elevados de ácido cítrico. La planta de melón de acuerdo con la invención que comprende un pH bajo acumula niveles bajos de ácido málico. La planta de melón de acuerdo con la invención que comprende un rasgo de pH bajo tiene adicionalmente la facultad de acumular niveles relevantes de azúcares, por ejemplo sacarosa y de acumular niveles elevados de ácido cítrico, y de acumular niveles bajos de ácido málico.

## ES 2 313 273 T3

En una realización, la planta de melón que comprende un pH bajo es una planta de la línea IND-35 o un descendiente de la misma.

5 La presente invención describe adicionalmente un método para producir semillas de una planta de acuerdo con la presente invención que comprende obtener una planta de la presente invención, autopolinizar dicha planta o cruzar dicha planta con otra planta de melón, y recoger la semilla de la progenie. La presente invención describe adicionalmente un método para propagar vegetativamente una planta de melón de acuerdo con la presente invención. La presente invención describe adicionalmente un método para producir un fruto que comprende plantar una planta de acuerdo con la presente invención, cultivar dicha planta y recolectar un fruto, en donde dicho fruto comprende las características descritas en esta memoria. El método comprende adicionalmente almacenar dicho fruto, por ejemplo como se describe en esta memoria. El método comprende adicionalmente transportar dicho fruto. En una realización, las características de dicho fruto descritas en esta memoria se mantienen estables durante el almacenamiento de dicho fruto. En una realización, las características de dicho fruto descritas en esta memoria se mantienen estables durante el almacenamiento de dicho fruto. En una realización, una planta de la presente invención es una línea endogámica, un híbrido, un dihaploide, o un clon propagado vegetativamente.

La presente invención proporciona por tanto frutos de melón que ofrecen un componente ácido agradable pero que evitan un sabor astringente. Esto mejora o complementa los sabores de melón a su potencial máximo. Estas combinaciones de contenido de ácidos orgánicos y pH bajo con contenidos elevados de azúcares proporcionan nuevas gamas y clases de sabores agradables al paladar para consumo fresco o para la industria de zumos frescos o cortes frescos. El pH bajo en la pulpa del fruto previene también la contaminación bacteriana en los procesos industriales de cortes y zumos frescos.

### Definiciones

25 Rasgo: característica o fenotipo. Por ejemplo, en el contexto de la presente invención un rasgo de pH bajo confiere un pH bajo, por ejemplo desde aproximadamente 4,2 a aproximadamente 5,6, a la pulpa de un fruto de melón. Un rasgo puede ser heredado de una manera dominante o recesiva, o de manera dominante parcial o incompleta. Un rasgo puede ser monogénico o poligénico, o puede ser también resultado de la interacción de uno o más genes con el medio ambiente.

Monogénico: determinado por un solo locus.

35 Poligénico: determinado por más de un locus.

Dominante: da como resultado una manifestación fenotípica completa en estado heterocigótico u homocigótico.

Recesivo: se manifiesta en sí mismo únicamente cuando está presente en estado homocigótico.

40 Dominancia parcial o incompleta: cuando está presente en la etapa heterocigótica determina un fenotipo que es intermedio respecto al de la etapa homocigótica o cuando el rasgo está ausente.

Retrocruzamiento: el retrocruzamiento es un proceso en el cual una progenie híbrida se cruza de nuevo repetidas veces con uno de los parentales.

45 Locus: región en un cromosoma, que comprende un gen que contribuye a un rasgo.

Eslabón genético: asociación de caracteres en herencia debida a la localización de genes en proximidad en el mismo cromosoma. Se mide por el porcentaje de recombinación entre loci (centi-Morgan, cM).

50 Loci Cuantitativos de Rasgo (QTL): Los loci cuantitativos de rasgo (QTL) hacen referencia a loci genéticos que controlan en cierto grado rasgos numéricamente representables que están distribuidos usualmente de modo continuo.

55 Isogénicas: Plantas que son genéticamente idénticas, excepto que las mismas pueden diferir por la presencia o ausencia de un gen, un locus que confiere un rasgo o secuencia de DNA heteróloga.

Selección asistida por marcadores: Hace referencia al proceso de seleccionar un rasgo deseado o rasgos deseados en una planta o plantas por detección de uno o más ácidos nucleicos de la planta, en donde el ácido nucleico está asociado con el rasgo deseado.

60 Dihaploide: Duplicación del estado haploide (cromosoma simple) del genoma (v.g. por cultivo de las anteras o cultivo de microsporas) que proporciona una planta homocigótica completa.

65 Planta "testadora": Planta utilizada para caracterizar genéticamente un rasgo en una planta a testar. Típicamente, la planta a testar se cruza con una planta "testadora" y se registra la relación de segregación del rasgo en la progenie del cruzamiento.

## ES 2 313 273 T3

Gen: Unidad de herencia. Los genes están localizados en loci fijos en los cromosomas y pueden existir en una serie de formas alternativas denominadas alelos.

5 Alelo: Uno de un par o serie de formas de un gen, que son alternativas en herencia, debido a que están situadas en el mismo locus en cromosomas homólogos.

Homocigótico: que tiene alelos iguales en uno o más loci correspondiente en cromosomas homólogos.

10 Heterocigótico: que tiene alelos diferentes en uno o más loci correspondientes en cromosomas homólogos.

Gen de pH bajo: gen que, cuando está presente en el genoma de una planta, conduce a un pH inferior de la pulpa de un fruto de dicha planta, cuando se compara con una planta que no comprende dicho gen.

15 Planta de melón de pH bajo: planta de melón que comprende un rasgo de pH bajo. En una realización, el pH de un fruto de una planta de melón de pH bajo es de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 5,6.

*Cucumis melo* L: designado también en esta memoria como *C. melo* o melón.

20 Cavidad: se refiere al centro del fruto del melón que contiene semillas y tejidos maternos.

Sólidos solubles: se refiere al porcentaje de material sólido encontrado en el tejido del fruto, cuya gran mayoría está constituida por azúcares.

25 Climatérico/no climatérico: como se define por ejemplo en Watkins (2002) "Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control" en: Michael Knee (compilador) "Fruit Quality and its Biological Basis". Sheffield Academic Press, Sheffield, Reino Unido, Capítulo 8, págs. 180-224, en particular en la página 181, sección 8.2.1, primeros dos párrafos.

30 Melón cambiante: cambiante se refiere al cambio acusado en el color de la piel de un fruto de melón cuando el mismo alcanza la madurez, por ejemplo de piel verde a amarilla en los tipos Galia, o de piel gris a amarillo cremoso en los tipos Charentais, mientras que el color de la piel de un fruto de un melón no cambiante o poco cambiante no cambia espectacularmente en la maduración, por ejemplo el aumento en el componente amarillo en el tipo Piel de Sapo.

35

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona plantas de *C. melo* capaces de producir frutos con sabores nuevos. En particular, la presente invención produce plantas de melón capaces de producir frutos con nuevas combinaciones de contenidos de ácidos orgánicos, pH y contenidos de azúcar. Los autores de la presente solicitud han identificado que los frutos de melón contienen diversos niveles de ácidos orgánicos, v.g. ácido cítrico. Los autores de la presente solicitud han identificado también que los frutos de melón contienen diversos contenidos relativos de ácido cítrico y ácido málico. Además, los autores de la presente solicitud han determinado que por introducción de un rasgo de pH bajo en un fondo de melón dulce, se obtienen una reducción de pH y un aumento en el contenido de ácido cítrico en el fruto, lo que expande adicionalmente la posibilidad de manipular el sabor de un fruto de melón. En una realización, los frutos de melón de la presente invención tienen contenidos bajos de ácido málico. De acuerdo con ello, la presente invención describe plantas de melón que producen frutos que tienen contenidos elevados de ácido cítrico y pH menor, como se describe en esta memoria. En una realización, los niveles de azúcar observados en los frutos de las plantas de la presente invención se mantienen en los niveles presentes en los frutos de melón disponibles actualmente o se incrementan. De acuerdo con ello, las plantas de la presente invención son capaces de producir frutos con sabores nuevos y agradables. Se llevaron a cabo medidas de pH, contenidos de ácido cítrico y de ácido málico, y contenidos de azúcar descritos en esta memoria, y se muestran en los Ejemplos 1 a 5. Las Tablas 1A y 1B de esta memoria describen plantas de melón representativas de acuerdo con la presente invención y sus frutos.

55 En una realización, las plantas de melón de la presente invención son capaces de producir fruto con contenido de ácido cítrico igual o mayor que aproximadamente 400 mg por 100 g de peso fresco (pf). En una realización, las plantas de melón de la presente invención son capaces de producir fruto con un pH de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 5,6. En una realización, las plantas de melón de la presente invención son capaces de producir fruto con un contenido de azúcar igual o mayor que aproximadamente 5,0 g por 100 g de pf. En una realización, la presente invención describe plantas de melón capaces de producir fruto con contenido de ácido cítrico igual o mayor que aproximadamente 400 mg por 100 g de pf, pH de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 5,6, y contenido de azúcar igual o mayor que aproximadamente 5,0 g por 100 g de pf.

65 La presente invención se refiere a una planta de *C. melo* capaz de producir un fruto que comprende en la madurez:

a) aproximadamente 400 mg a aproximadamente 1200 mg de ácido cítrico por 100 g de pf;

## ES 2 313 273 T3

- b) pH de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 5,6; y
- c) aproximadamente 5,0 g a aproximadamente 15,0 g de azúcar por 100 g de pf,

5 en donde la relación de ácido cítrico a ácido málico en dicho fruto es mayor que 5.

10 En una realización, el fruto comprende aproximadamente 400 mg a aproximadamente 1000 mg de ácido cítrico por 100 g de pf. En una realización, el fruto comprende aproximadamente 450 mg a aproximadamente 950 mg de ácido cítrico por 100 g de pf; y en una realización, aproximadamente 475 mg a aproximadamente 900 mg de ácido cítrico por 100 g de pf. En una realización, el fruto tiene un pH de aproximadamente 4,3 a aproximadamente 5,4, y en una realización aproximadamente 4,4 a aproximadamente 5,1. En una realización, el fruto comprende aproximadamente 5,5 g a aproximadamente 13,0 g de azúcar por 100 g de pf. En una realización, el fruto comprende aproximadamente 7,0 g a aproximadamente 15,0 g de azúcar por 100 g de pf.

15 En una realización, la relación de ácido cítrico a ácido málico en un fruto de dicha planta es mayor que 4,4, en una realización mayor que 5, en una realización mayor que 10. La relación de ácido cítrico a ácido málico en un fruto de dicha planta puede ser menor que 450, en particular menor que 200, en particular menor que 150. En una realización, un fruto de la planta de acuerdo con la invención comprende menos de aproximadamente 85 mg de ácido málico por 20 100 g de pf; en una realización, menos de aproximadamente 75 mg de ácido málico por 100 g de pf.

25 La relación de sacarosa a hexosas en un fruto de dicha planta puede ser aproximadamente 1:1; en particular entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:2, y de manera especial entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 2:1.

En una realización, la pulpa de un fruto de la planta de acuerdo con la invención es naranja, blanca, verde o amarilla. En una realización, dicho fruto es comestible en consumo fresco. En una realización, el mesocarpio de un fruto de dicha planta representa más del 50% del peso total de fruto fresco.

30 En una realización, la planta de *C. melo* comprende un rasgo de pH bajo. En una realización, el rasgo de pH bajo puede obtenerse a partir de una planta de la línea IND-35, semillas representativas de la cual se han depositado bajo el número de Acceso NCIMB 41202, o un descendiente de dicha línea IND-35. El rasgo de pH bajo puede ser homocigótico o heterocigótico en dicha planta.

35 En una realización de la presente invención, se describen plantas de melón a las que se hace referencia como plantas "cítrico +". Tales plantas son capaces de producir un fruto de jugo muy dulce con sabor agrio refrescante ácido. Tales frutos comprenden contenidos elevados de ácido cítrico y pH bajo, aumentado el sabor ácido y proporcionando una percepción agria. Esto se compensa por un contenido elevado de azúcar, en una realización por niveles elevados de azúcares reductores (glucosa y fructosa). El alto contenido de azúcares reductores es en particular acusado en las etapas maduras tempranas. La combinación de sabores agrio y dulce, que no puede obtenerse por el melón dulce disponible actualmente, es apreciada por los consumidores. La combinación de melón agridulce agrio refrescante satisface esta necesidad. Esta percepción agria oculta por otra parte sabores demasiado sosos y pobres de los frutos maduros tempranos. En una realización, las plantas cítrico + se obtienen generalmente por introducción de un rasgo de pH bajo, por ejemplo de la línea IND-35, en un fondo de melón oriental. En una realización, el fondo de melón oriental se selecciona para uno o más de los criterios siguientes: contenido elevado de ácido cítrico, contenido bajo de ácido málico, contenido elevado de ácido cítrico a ácido málico, contenido elevado de azúcar, contenido elevado de hexosas, relación alta de hexosas a sacarosa, y jugosidad alta. Durante la introducción del rasgo de pH bajo, se mantiene una selección cuidadosa para las características anteriores hasta que se obtiene una progenie deseada.

50 Por ejemplo, los Ejemplos 9, 10 y 11 describen la construcción de tales plantas. Plantas alternativas de *C. melo* pueden cribarse también respecto a las características deseadas y se utilizan como materiales de partida como se describe en esta memoria.

55 En una realización, un fruto de una planta cítrico + de la presente invención comprende en la madurez:

- a) aproximadamente 600 a aproximadamente 1200 mg de ácido cítrico por 100 g de pf;
- b) pH de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 5,1; y
- 60 c) aproximadamente 5,0 g a aproximadamente 15,0 g de azúcar por 100 g de pf; en donde la relación de ácido cítrico a ácido málico en dicho fruto es mayor que 6.

65 En una realización, el producto comprende aproximadamente 600 a aproximadamente 1000 mg de ácido cítrico por 100 g de pf. En una realización, el fruto comprende aproximadamente 650 a aproximadamente 950 mg de ácido cítrico por 100 g de pf.

En una realización, el pH del fruto es aproximadamente 4,4 a aproximadamente 5,0.

## ES 2 313 273 T3

En una realización, dicho fruto comprende aproximadamente 7,0 g a aproximadamente 13,0 g de azúcar por 100 g de pf. En una realización, la relación de ácido cítrico a ácido málico en un fruto de dicha planta es mayor que 6; en una realización mayor que 7; en una realización mayor que 10. La relación de ácido cítrico a ácido málico en un fruto de dicha planta puede ser menor que 450, en particular menor que 200. En una realización, un fruto de la planta de acuerdo con la invención comprende menos de aproximadamente 85 mg de ácido málico por 100 g de pf; en una realización menos de aproximadamente 75 mg de ácido málico por 100 g de pf, y en una realización menos de aproximadamente 60 mg de ácido málico por 100 g de pf.

La invención se refiere adicionalmente a un fruto de una planta que tiene una pulpa verde o blanca y comprende en la madurez:

- a) aproximadamente 600 a aproximadamente 1200 mg de ácido cítrico por 100 g de pf;
- b) pH de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 5,1; y
- c) aproximadamente 5,0 g a aproximadamente 15,0 g de azúcar por 100 g de pf; en donde la relación de ácido cítrico a ácido málico en dicho fruto es mayor que 6.

En una realización, el fruto comprende aproximadamente 600 a aproximadamente 1000 mg de ácido cítrico por 100 g de pf. En una realización, dicho fruto con pulpa verde o blanca comprende en la madurez aproximadamente 8,0 g a aproximadamente 12,0 g de azúcar por 100 g de pf. En una realización, dicho fruto con pulpa verde o blanca tiene en la madurez una relación de ácido cítrico a ácido málico entre aproximadamente 25 y 200. En una realización, el contenido de ácido málico de dicho fruto es menor que aproximadamente 50 mg de ácido málico por 100 g de pf, en una realización menor que aproximadamente 30 mg de ácido málico por 100 g de pf. En una realización, la relación de sacarosa a hexosas en un fruto de dicha planta es aproximadamente 1:1; en una realización entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 2:1.

En una realización, un fruto de una planta de la presente invención tiene una pulpa naranja y comprende en la madurez:

- a) aproximadamente 600 mg a aproximadamente 750 mg de ácido cítrico por 100 g de pf;
- b) pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,1; y
- c) aproximadamente 6,0 g a aproximadamente 13,0 g de azúcar por 100 g de pf; en donde la relación de ácido cítrico a ácido málico en dicho fruto es mayor que 6.

En una realización, el producto comprende aproximadamente 7,0 g a aproximadamente 13,0 g de azúcar por 100 g de pf.

La presente invención describe adicionalmente una planta de melón capaz de producir un fruto dulce y aromático con sabor agrio suavemente frutal, al que se hace referencia en esta memoria como planta de melón o fruto "cítrico -". Tales frutos comprenden contenidos relativamente altos de ácido cítrico y pH moderadamente bajo. Este pH moderadamente bajo produce una percepción frutal agria que oculta otros sabores todavía demasiado sosos y pobres de los frutos tempranos maduros y sin afectar a la expresión plena de los sabores y colores de la pulpa del fruto ulterior totalmente maduro. Adicionalmente, durante la maduración (madurez temprana a tardía), los frutos siguen aumentos relevantes de pH, disminución de la acidez, en línea con débil el potencial tampón del contenido bajo de ácido cítrico. Esto proporciona frutos totalmente maduros con una nota agria muy ligera hasta la expresión total de los sabores de melón muy dulces y aromáticos. El sabor del melón esta basado fundamentalmente en el dulzor y los aromas que consigue usualmente la expresión plena de las etapas de maduración del fruto realmente avanzadas. Los melones maduros tempranos se describen a menudo como desagradablemente insípidos, dado que los azúcares y aromas son inferiores a las expectativas y no está presente ningún otro componente de sabor. En otros frutos, tales como la fresa, el melocotón o las naranjas, el sabor ácido establece un complemento muy apreciado en estas etapas maduras tempranas. La combinación agria y dulce del melón moderadamente frutal evita o limita el riesgo de insipidez en los melones maduros tempranos.

Las plantas cítrico - se obtienen por introducción de un rasgo de pH bajo, por ejemplo de la línea IND-35, en un fondo de melón Charentais. En una realización, el fondo de melón Charentais se selecciona por uno o más de los criterios siguientes: contenido bajo de ácido cítrico, contenido bajo de ácido málico, contenido relativamente alto de ácido cítrico a ácido málico, contenido elevado de azúcares, y contenido elevado de sacarosa. Durante la introducción del rasgo de pH bajo, se mantiene una selección cuidadosa de las características anteriores hasta que se obtiene una progenie deseada.

Por ejemplo, el Ejemplo 11 describe la preparación de tales plantas. Plantas alternativas de *C. melo* pueden cribarse también respecto a las características deseadas y pueden utilizarse como materiales de partida como se describe en esta memoria.

## ES 2 313 273 T3

El fruto de una planta cítrico - comprende en la madurez:

- a) aproximadamente 400 a aproximadamente 650 mg de ácido cítrico por 100 g de pf, de manera especial aproximadamente 450 a aproximadamente 600 mg de ácido cítrico por 100 g de pf;
- b) pH de aproximadamente 4,6 a aproximadamente 5,6, en particular un pH de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,4, y de modo más particular de aproximadamente 5,2;
- c) aproximadamente 5,0 g a aproximadamente 13,0 g de azúcar por 100 g de pf, en particular aproximadamente 5,5 g a aproximadamente 13,0 g de azúcar por 100 g de pf;

en particular aproximadamente 6,0 g a aproximadamente 12,0 g de azúcares por 100 g de pf, y de modo más particular aproximadamente 7,0 g a aproximadamente 13,0 g de azúcares por 100 g de pf. Se describe adicionalmente un fruto de una planta que tiene pulpa naranja y comprende en la madurez:

- a) aproximadamente 400 mg a aproximadamente 550 mg de ácido cítrico por 100 g de pf;
- b) pH de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,6; y
- c) aproximadamente 5,0 g a aproximadamente 11,0 g de azúcares por 100 g de pf, en particular aproximadamente 7,0 g a aproximadamente 11,0 g de azúcares por 100 g de pf.

La relación de ácido cítrico a ácido málico en dicho fruto esta comprendida entre aproximadamente 4,4 y 10.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1A: resumen de datos para las líneas

La Tabla 1A describe líneas representativas de la presente invención. Los datos representados en la Tabla 1A son valores medios basados en medidas de pruebas individuales. Los datos para las pruebas individuales se describen en las Tablas 9-13 en los Ejemplos que siguen.

<u>LÍNEAS (media) Datos</u> de invernadero		Nº frt.	azúcar tot. val. medio g/100 g	sacarosa val. medio g/100 g	hexosa val. medio g/100 g	hex./sac inv. actividad	pH valor medio	cítrico val.med. mg/100 g	cítrico/ málico	málico val. med. mg/100 g
Pulpa Verde	YUSOL pH alto YUSAZ A pH bajo cítrico -	34 246	9,85 8,92	4,50 3,24	5,34 5,68	1,1 1,8	6,05 4,67	265 577	24 19	11 31
	YUSAZ B pH bajo cítrico +	30	8,70	2,16	6,54	3,0	4,59	832	16	53
Pulpa Blanca	SOLAZ/1 Línea SOLAZ/2 Línea	71 43	6,97 6,19	2,16 1,92	4,81 4,27	2,2 2,2	4,59 4,64	579 590	23 47	25 13
Pulpa Naranja	L53AZ A pH bajo cítrico - L53AZ B pH bajo cítrico + L53 pH alto	76 52 10	7,09 8,11 8,29	2,51 4,24 5,05	4,42 3,87 3,23	1,8 0,9 0,6	4,89 4,81 6,67	509 701 92	3 10 1	153 67 93

Tabla 1B: resumen de datos para híbridos

La Tabla 1B describe híbridos representativos de la presente invención. Los datos presentados en la Tabla 1B son valores medios basados en medidas de pruebas individuales. Los datos para las pruebas individuales se describen en las Tablas 9-13 en los Ejemplos que siguen. Mehari significa el parental femenino del híbrido MEHARI.

HÍBRIDOS(media) Datos de invernadero (PS) y Campo Abierto (OP)	N° frt.	azúcar tot. val. medio g/100 g	sacarosa val. medio g/100 g	hexosa val. medio g/100 g	hex./sac inv. actividad	pH valor medio	cítrico val.med. mg/100 g	cítrico/málico	málico val. med. mg/100 g
Pulpa Verde YUSAZ AX YUSOL	17	9,70	4,46	5,24	1,2	4,77	692	46	15
MILENIUM-DENEV F1	12	7,61	3,47	4,13	1,4	5,88	444	X	0
Pulpa Blanca SOLAZ1X YUSOL	26	9,71	6,40	3,31	0,5	4,75	760	58	13
SOLAZ2X YUSOL	13	9,08	6,26	2,82	0,5	4,70	162	162	6
SOLAR F1	8	8,93	4,39	4,54	1,2	6,48	35	35	9
Pulpa Naranja Mehari/ L53AZ A	13	7,34	2,24	5,10	2,3	4,98	487	6	78
Mehari/ L53AZ B	17	8,35	3,37	4,97	1,5	4,76	663	11	60
Mehari/ L53	14	8,80	3,96	4,84	L2	6,31	274	5	54

## ES 2 313 273 T3

La presente invención demuestra que la manipulación del grado de acidez en un fruto produce variaciones de sabor valiosas. La acidez es un resultado de la interacción entre varios parámetros, siendo el pH uno de los parámetros más importantes junto con los contenidos y composiciones de ácidos orgánicos. El pH influye notablemente en el grado de disociación de los ácidos implicados en el sabor. Cada ácido tiene una constante de disociación diferente (pKa), que hace referencia al pH para el cual el 50% del ácido está disociado en sus iones relativos y H<sup>+</sup>. Un pH bajo da como resultado que una parte mayor del ácido no se encuentre en forma disociada. La percepción de acidez proviene principalmente de la forma no disociada del ácido. Esto explica por qué, a niveles de pH más altos, ácidos más débiles tales como los ácidos orgánicos con un pKa mayor se perciben como más ácidos que los ácidos más fuertes.

El pH de una solución está correlacionado con la concentración y el pKa del ácido. Las soluciones equinormales de ácidos más fuertes son más ácidas que las más débiles, dado que tienen un pH mucho menor. Cuanto mayor sea la concentración del ácido (acidez valorable) tanto más agrio se percibirá el ácido. El sabor agrio está correlacionado también con la estructura química del acidulante, el número de grupos carboxílicos, el peso molecular y la polaridad de la molécula (véase por ejemplo PURAC Biochem, Gorinchen, Países Bajos, "Sabor Especial", www.Purac.com). Además del sabor agrio, cada ácido de los alimentos tiene sus propias características de sabor en términos de tiempo de duración, intensidad de sabor y la contribución a otras notas de sabor no ácidas tales como astringencia, amargor y dulzor.

Los principales ácidos orgánicos en los frutos de melón son ácido succínico, ácido málico y ácido cítrico (Wang *et al.* (1996) J. Agric. Food Chem. 44: 210-216). El ácido málico tiende a asociarse con las fases muy inmaduras o con la senescencia y las fases degenerativas del fruto supermaduro, y generalmente no se prefiere su dominancia en el sabor. En la pulpa del fruto, se observan gradientes de contenidos crecientes de ácido málico desde cerca de la cavidad de las semillas hasta cerca de la piel del fruto. El ácido cítrico tiene un pKa menor que el ácido málico. El ácido cítrico tiene más efecto agrio y limpio, que domina en muchos casos a otras notas de sabor o aromas. En contraposición con el ácido málico, se observan en la pulpa del fruto gradientes de contenidos decrecientes de ácido cítrico desde las zonas más maduras hasta cerca de la cavidad de las semillas y hasta las zonas más próximas a la piel del fruto. Un gradiente de este tipo se observa también para los azúcares.

Así pues, en los frutos de melón de la presente invención, los contenidos mayores de azúcar y contenidos elevados de ácido cítrico tienden a asociarse en la pulpa del fruto para proporcionar contenidos elevados de ambos en las zonas más sabrosas del fruto, dando como resultado un nuevo sabor muy agradable.

Asimismo, en los frutos de melón de la presente invención, la percepción ácida es mayor cuando el pH es bajo y el contenido de ácido cítrico alto.

En una realización, frutos de acuerdo con la presente invención se sometieron a test por un panel de Expertos de degustadores entrenados. Las características sensoriales de los frutos se midieron en una escala de valoración de 0 a 9. El pH, los contenidos de ácidos orgánicos y los contenidos de azúcar de los frutos se midieron también. Los resultados del panel de Expertos se describen en el Ejemplo 12, Tablas 14 y 15. El análisis sensorial demuestra que el sabor ácido en los frutos de la presente invención es función del pH y del contenido de ácido cítrico en el fruto. Sobre la base de los datos recogidos de frutos maduros y no maduros, el panel de Expertos determinó la fórmula siguiente para la correlación entre el sabor ácido y el pH y los contenidos de ácido cítrico en un fruto: Sabor ácido =  $13,12 - (2,97 \times \text{pH}) + (0,00587 \times \text{contenido de ácido cítrico (mg/100 g de pf)})$ , con  $r^2 = 0,70$ .

De acuerdo con ello, en una realización, la presente invención describe una planta de *C. melo* capaz de producir fruto que comprende un sabor ácido superior a aproximadamente 0,5 tal como se determina por un panel de Expertos. En una realización, la presente invención describe una planta de *C. melo* capaz de producir fruto que comprende un sabor ácido de aproximadamente 1,6 o superior. En una realización, la presente invención describe una planta de *C. melo* capaz de producir fruto que comprende un sabor ácido superior a aproximadamente 0,5 y un sabor de azúcar de aproximadamente 4,3 o superior. En una realización, la presente invención describe una planta de *C. melo* capaz de producir fruto que comprende un sabor ácido de aproximadamente 1,6 a aproximadamente 3,8 y un sabor de azúcar de aproximadamente 4,3 a aproximadamente 5,8.

En una realización, la presente invención describe una planta de *C. melo* capaz de producir fruto que comprende un sabor ácido de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,8 y un sabor de azúcar de aproximadamente 4,3 a aproximadamente 5,6. Los híbridos YUSOL X SOLAZ y Mehari X L53 AZB son ejemplos representativos de una planta de este tipo.

En una realización, dicho fruto comprende un pH y contenido de ácido cítrico como se describe en esta memoria. En una realización, la presente invención describe una planta de *C. melo* capaz de producir fruto que comprende un sabor ácido de aproximadamente 1,6 a aproximadamente 3,0 y un sabor de azúcar de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 5,8. Los híbridos YUSAZ X YUSOL, Mehari XL53 AZA y TD X L53 AZA son ejemplos representativos de una planta de este tipo.

En una realización, dicho fruto comprende un pH y un contenido de ácido cítrico como se describe en esta memoria. En una realización, dicho fruto comprende un pH, contenidos de ácidos orgánicos y composiciones y contenidos y composiciones de azúcar como se describen en esta memoria.

## ES 2 313 273 T3

Debe entenderse que los valores de los paneles de expertos varían dependiendo del pH, contenido de ácido cítrico y contenido de azúcar de un fruto.

Los autores de la presente invención han cribado entradas y accesos de melones para el contenido en ácido cítrico y azúcares y composiciones y han determinado variaciones dentro de los tipos de *C. melo* (véase la Tabla 2). Por ejemplo, se ha encontrado que algunos melones tipo Charentais tienen contenidos bajos de ácido cítrico (por ejemplo Lunastar en la Tabla 2). Se encontró también que algunos frutos de tipo Charentais tienen una relación relativamente baja de ácido cítrico a ácido málico y una relación alta de sacarosa a hexosas. Por otro lado, se encontró que los melones de tipo oriental, tales como el melón de los tipos Japanese Rocky, tienen contenidos mayores de ácido cítrico (por ejemplo, YUCA en la Tabla 2). Un ejemplo representativo de YUCA ha sido depositado con NCIMB, Aberdeen, AB24 3RY, Escocia el 17 de diciembre de 2003 como YUC-15 bajo el número de Acceso NCIMB 41203. Se encuentra también que estos melones tienen relaciones altas de ácido cítrico a ácido málico y relaciones altas de hexosa a sacarosa. Se ha encontrado también que algunos melones de tipo Galia, tales como MG755, tienen contenidos elevados de ácido cítrico. Sorprendentemente, de acuerdo con la presente invención, en un cruce entre un melón tipo Japanese y un melón tipo Charentais (Prince PF en la Tabla 2), el contenido elevado de ácido cítrico del melón tipo Japanese podía disociarse de la relación alta de hexosa a sacarosa y combinarse con la relación alta de sacarosa a hexosa del melón tipo Charentais. La invención reconoció adicionalmente que existen también variaciones en los contenidos de ácido cítrico entre los accesos no dulces tales como Faqqous e IND-35 (contenido bajo de ácido cítrico en Faqqous cuando se compara con IND-35, Tabla 2).

Asimismo, aunque se asumió generalmente en la técnica que el pH bajo y la acumulación alta de azúcar no eran frecuentes o incluso compatibles en el mismo fruto de melón (Stepanski *et al.* (1999)), los autores de la presente invención han sido capaces de combinar dichas características de pH y ácidos orgánicos arriba descritas con los contenidos deseados de azúcares en los frutos (véase v.g. la Tabla 3).

TABLA 2

*Variación en los contenidos de ácido cítrico en diversos tipos y variedades de melón (datos de análisis de frutos, prueba Sarrians, agosto 1997)*

Nombre	No. de frutos	Ri	pH	Acido cítrico (mg / 100 g)	Sacarosa (g/100 g)	Hexosas Glucosa	Glucosa (g/100 g)	Fructosa (g/100 g)	Azúcar Total (g/100 g)
Lunastar (Charentais)	6	11.8	6.8	159	6.7	3.2	1.6	1.6	9.2
Yuca-18-3-8	8	10.5	6.7	286	3.8	4.2	2.3	1.9	8.0
MG 755 OA	4		6.8	294	11.4	3.7	2.1	1.7	15.1
Prince PF (Japanese X Charentais)	5		6.1	438	10.0	3.3	1.2	2.1	13.3
Sancho	4			409	3.7	4.1	2.1	1.9	7.8
Fagouss Egypt	10	3.8	5.6	35	0.1	1.9	0.9	1.0	1.9
Fagouss Jim MC Orcigt	6	3.3	5.2	62	0.1	2.1	0.9	1.2	2.2
Fagouss Jordany	11	3.7	5.1	125	0.1	2.1	0.9	1.2	2.2
IND35-1	8	4.5	4.9	340	0.6	3.4	1.8	1.7	4.0

Ri: Brix, Índice de refracción, medición de sólidos solubles.

# ES 2 313 273 T3

TABLA 3

*Acumulación de azúcar frente a pH*

Análisis estadístico de acumulación de azúcar (Brix) frente a pH en poblaciones F2 de un cruce entre IND-35 y YUCA o OGEL (Agadir 98). El análisis no muestra correlación negativa alguna entre los valores Brix y el pH						
		pH<5,5RI		pH>5,5 RI		ANOVA
		pH (Brix)		pH (Brix)		P=0,05
<b>IND35/YUCA 15 F2</b>	Nº plantas	68	68	22	22	<b>P=0,98</b> <b>Diferencia</b> <b>No</b> <b>Significativa</b> <b>en Poblaciones</b> <b>Brix</b>
	Máximo	13,00	5,40	13,60	7,00	
	Media	8,03	4,53	8,01	5,85	
	Desviación estándar	2,34	0,30	2,72	0,37	
	Mínimo	2,40	3,80	2,40	5,50	
<b>IND35/OGEL- 17 F2</b>	Nº plantas	98	98	39	39	<b>P=0,65</b> <b>Diferencia</b> <b>No</b> <b>Significativa</b> <b>en Poblaciones</b> <b>Brix</b>
	Máximo	13,00	5,45	12,20	7,50	
	Media	7,75	4,70	7,93	5,97	
	Desviación estándar	2,16	0,33	1,89	0,35	
	Mínimo	2,80	3,90	4,20	5,50	
<b>IND.35</b>	Nº plantas	29	29			
	Máximo	7,60	5,40			
	Media	5,45	5,40			
	Desviación estándar	1,18	0,31			
	Mínimo	3,00	4,10			

La presente invención describe adicionalmente la incorporación de un rasgo de pH bajo en fondos dulces de *C. melo*. La presencia del rasgo de pH bajo en fondos dulces de *C. melo* permitió rebajar el pH y aumentar las concentraciones de ácidos orgánicos en la pulpa del fruto y combinar pH y contenidos de ácido cítrico deseables con concentraciones y contenidos apropiados de azúcar, dando como resultado nuevos sabores agradables.

En una realización, un bajo valor de pH está determinado por un gen de pH bajo. En una realización, un gen de pH bajo se obtiene a partir de un acceso o cultivar de melón salvaje. En una realización, un acceso o cultivar de melón salvaje utilizado como donante para el gen de pH bajo comprende rasgos que facilitan la producción de melones comerciales con características agronómicas aceptables y la producción de frutos con sabor deseable. En una realización, dicho donante tiene la capacidad de acumular niveles relevantes de azúcares, tales como sacarosa. En una realización, dicho acceso a variedad cultivada de melón salvaje tiene al menos una de las características siguientes: comportamiento no climático, tamaño de fruto relativamente mayor y componente de mesocarpio, pulpa crujiente.

En una realización, el rasgo de pH bajo se obtiene de la línea IND-35, semillas representativas de la cual se depositaron con NCIMB, Aberdeen, AB24 3RY, Escocia el 17 de diciembre de 2003 bajo el número de acceso NCIMB 41202. Este es un acceso de *C. melo* de la India, que podría clasificarse dentro de la variedad botánica chito, pero puede clasificarse mejor como la variedad acidulus (Naudin, Pitrat *et al.*) debido a su mayor tamaño.

## ES 2 313 273 T3

El ácido cítrico es el principal ácido orgánico en los frutos de la línea IND-35 (hasta 911 mg de ácido cítrico por 100 g de pf), mientras que los contenidos de ácido málico son inferiores a 50 mg por 100 g de pf. Sorprendentemente, los frutos de IND-35 tienen también la capacidad de acumular niveles relevantes de sacarosa (hasta 1,7 g de sacarosa por 100 g de pf y 5,6 g de azúcares totales por 100 g de pf después de ciclos de fruto largos, es decir, después de recolección tardía 50 ó 53 días después de la constitución del fruto). La Tabla 2 presenta también análisis de frutos de IND-35 que muestran un pH de aproximadamente 4,9, un contenido de ácido cítrico de aproximadamente 340 mg/100 g de peso fresco (pf), y un contenido de azúcar de aproximadamente 4,0 g/100 g de pf.

En una realización, el rasgo de pH bajo co-segrega con un marcador molecular. Un marcador molecular es un fragmento de DNA amplificado por PCR, v.g. un marcador SSR o un marcador RAPDS. La presencia o ausencia de un fragmento de DNA amplificado es indicativa de la presencia o ausencia del rasgo propiamente dicho o de un alelo particular del rasgo. Una diferencia en la longitud de un fragmento de DNA amplificado es indicativa de un alelo particular de un rasgo, y permite por tanto distinguir entre alelos diferentes de un rasgo. La presente invención describe marcadores, que distinguen entre fuentes diferentes de rasgo de pH bajo, y respecto a la presencia o ausencia de un rasgo de pH bajo en una planta. Por ejemplo, un marcador de este tipo es CMAT141, descrito en Danin-Poleg *et al.* (2001) *Theor. Appl. Genet.* 102: 61-72 y Danin-Poleg *et al.* (2002) *Euphytica* 125: 373-384. Otros ejemplos de marcadores moleculares son NE0585 y NE1746 descritos en esta memoria (véase el Ejemplo 13). Estos marcadores están estrechamente relacionados con el locus del gen de pH. Los marcadores CMAT141 y NE0585 están situados a un lado del gen de pH bajo, mientras que el marcador NE1746 se encuentra en el otro lado del gen de pH bajo.

Los autores de la presente invención han determinado que diversas fuentes de rasgo de pH bajo amplifican fragmentos de DNA de diferente longitud, cuando se utilizan los iniciadores para los marcadores (fragmentos de ácido, véase Ejemplo 14, Tabla 16). Por ejemplo, en plantas de Faggous se amplifica un fragmento de aproximadamente 176 pb utilizando CMAT141. En plantas de los accesos PI414723, PI414724, PI161375 y PI124112 se amplifica un fragmento de aproximadamente 175 pb. En contraposición, en plantas de IND-35, descritas en esta memoria, se amplifican fragmentos únicos de aproximadamente 168 pb y de aproximadamente 173 pb. Utilizando el marcador NE0585, se amplifican fragmentos únicos de aproximadamente 230 pb y aproximadamente 232 pb para IND-35. Utilizando el marcador NE1746, se amplifica un fragmento único de aproximadamente 127 pb para IND-35. Otro fragmento de aproximadamente 124 pb se amplifica para IND-35, que está por ejemplo ausente en Faggous.

Se analizaron también plantas que no comprendían el rasgo de pH bajo utilizando los iniciadores descritos en esta memoria. Se determinó un cierto número de fragmentos de DNA asociados con la ausencia del rasgo de pH bajo (fragmentos básicos). Por ejemplo, utilizando los iniciadores de CMAT141, se detectaron fragmentos de aproximadamente 169 pb, aproximadamente 172 pb y aproximadamente 178 pb de longitud en plantas que no comprendían un rasgo de pH bajo. Utilizando los iniciadores de NE0585, se detectaron fragmentos de aproximadamente 218 pb, aproximadamente 229 pb, aproximadamente 234 pb y aproximadamente 239 pb de longitud. Utilizando los iniciadores de NE1746, se detectaron fragmentos de aproximadamente 133 pb, aproximadamente 142 pb y aproximadamente 145 pb de longitud. Las personas expertas sabrían cómo analizar plantas ulteriores que no comprendan el rasgo de pH bajo y determinar fragmentos adicionales de DNA asociados con la ausencia del rasgo de pH bajo. Los tamaños indicados (en pb) no son absolutos, sino relativos a los productos de otros tamaños detectados con el mismo par de iniciadores. El tamaño real (exacto) de los fragmentos amplificados (v.g. determinados por secuenciación) podrían ser ligeramente diferentes (+/-1 pb) de los indicados en esta memoria.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención describe una planta de *C. melo* que comprende una secuencia de DNA que es un molde para la amplificación de un fragmento de DNA descrito en esta memoria utilizando los iniciadores descritos en esta memoria. Un fragmento de DNA de aproximadamente 168 pb a aproximadamente 178 pb se amplifica a partir del DNA de dicha planta cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador CMAT141. Se amplifica un fragmento de DNA de 168 pb, 173 pb, 169 pb, 172 pb ó 178 pb se amplifica cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador CMAT141. Se amplifica un fragmento de DNA de menos de 176 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador CMAT141. Se amplifica un fragmento de menos de 175 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador CMAT141. Se amplifica un fragmento de DNA de aproximadamente 218 pb a aproximadamente 253 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador NE0585. Se amplifica un fragmento de DNA de 230 pb, 232 pb, 218 pb, 229 pb, 234 pb ó 239 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador NE0585. Se amplifica un fragmento de DNA de aproximadamente 121 pb a aproximadamente 145 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador NE1746. Se amplifica un fragmento de DNA de 124 pb, 127 pb, 133 pb, 142 pb ó 145 pb cuando se utilizan los iniciadores capaces de identificar el marcador NE1746.

Los autores de la presente invención han separado el enlace entre un fragmento de DNA indicativo de un rasgo de pH bajo y un gen de pH bajo. En este caso, una secuencia de DNA, que es un molde para la amplificación de un fragmento básico, está enlazada a un rasgo de pH bajo. De acuerdo con ello, la presente invención describe una planta que comprende un rasgo de pH bajo que co-segrega con marcadores indicativos de un alelo básico, en particular cuando se utilizan los marcadores descritos en esta memoria. Los marcadores a un lado o a ambos lados del gen de pH son básicos.

En una realización, frutos de una planta de este tipo comprenden un pH dentro de los intervalos descritos en esta memoria. En una realización, frutos de una planta de este tipo comprenden el pH, contenidos y composiciones de azúcares y contenidos y composiciones de ácidos orgánicos que se describen en esta memoria.

## ES 2 313 273 T3

De acuerdo con ello, la presente invención describe una planta de *C. melo* que comprende una secuencia de DNA, que es un molde para amplificación de un fragmento de DNA básico, enlazado a un gen de pH bajo. La presente invención describe adicionalmente una planta de *C. melo* que comprende un fragmento de cromosoma que comprende una secuencia de DNA, que es un molde para la amplificación de un fragmento de DNA básico y un gen de pH bajo. Dicho fragmento cromosómico puede ser heterocigótico u homocigótico en dicha planta. La línea SOLAZ/2 descrita en esta memoria es un ejemplo representativo de una planta de *C. melo* de este tipo. En SOLAZ/2, se amplifican fragmentos de aproximadamente 172 pb, aproximadamente 229 pb y aproximadamente 124 pb utilizando los iniciadores de los marcadores CMAT141, NE0585 y NE1746, respectivamente.

La presente invención describe una planta de *C. melo* que comprende una secuencia de DNA, que es un molde para la amplificación de un fragmento de DNA básico, en un lado de un gen de pH bajo, un gen de pH bajo, y una secuencia de DNA, que es un molde para la amplificación de un fragmento de DNA básico, en el otro lado del gen de pH bajo, en donde ambas secuencias de DNA están unidas al gen de pH en dicha planta. La presente invención describe adicionalmente una planta de *C. melo* que comprende un fragmento de cromosoma que comprende una secuencia de DNA, que es un molde para la amplificación de un fragmento básico de DNA, a un lado de un gen de pH bajo, el gen de pH bajo y una secuencia de DNA, que es un molde para la amplificación de un fragmento de DNA básico, en el otro lado del gen de pH bajo. Dicho fragmento de cromosoma puede ser heterocigótico u homocigótico en dicha planta. La línea SOLAZ/1 descrita en esta memoria es un ejemplo representativo de una planta de *C. melo* de este tipo. En SOLAZ/1, se amplifican fragmentos de aproximadamente 172 pb, aproximadamente 239 pb y aproximadamente 142 pb utilizando los iniciadores de los marcadores CMAT141, NE0585 y NE1746, respectivamente. La línea YUSOL/3 descrita en esta memoria es otro ejemplo representativo de una planta de *C. melo* de este tipo. En YUSOL/3, se amplifican fragmentos de aproximadamente 172 pb, aproximadamente 239 pb y aproximadamente 145 pb utilizando los iniciadores de los marcadores CMAT141, NE0585 y NE1746, respectivamente.

De acuerdo con ello, la presente invención describe el uso de una planta de melón que comprende un rasgo de pH bajo para obtener una planta de melón de la presente invención. En una realización, la planta de melón que comprende un rasgo de pH bajo tiene adicionalmente la capacidad de acumular niveles relevantes de azúcares, por ejemplo sacarosa. En una realización, la planta de melón que comprende un pH bajo acumula niveles elevados de ácido cítrico. En una realización, la planta de melón que comprende un pH bajo acumula niveles bajos de ácido málico. En una realización, la planta de melón que comprende un pH bajo es una planta de la línea IND-35 o un descendiente de la misma.

En una realización, el rasgo de pH bajo se obtiene a partir de un descendiente de dicha línea IND-35. Las personas expertas reconocen que un rasgo de pH bajo puede obtenerse también a partir de otras fuentes. El rasgo de pH bajo en dichas otras fuentes es alélico para el rasgo de pH bajo en IND-35. En un aspecto de la invención, se realiza un test para determinar si una línea a testar para un gen de pH bajo comprende un gen alélico al de la línea IND-35. La línea IND-35 se utiliza como una línea testadora en un cruce con una línea a testar y la relación de segregación del fenotipo de pH bajo se determina en la prole resultante.

En una realización, se cruza una planta de la línea IND-35 con líneas de melón de mejora genética, que tienen preferiblemente contenidos elevados de ácido cítrico y niveles elevados de azúcar. Después de cada cruce, se seleccionan plantas que producen frutos que tienen pH bajo. La selección se lleva a cabo también para los contenidos incrementados de ácido cítrico y contenidos elevados de azúcar. Ejemplos de la introducción del rasgo de pH bajo en líneas de elite se describen en los Ejemplos 7-11.

Un marcador molecular como se describe anteriormente en esta memoria puede utilizarse para transferir el rasgo de pH en un fondo deseado, en particular en el método de aumento del contenido de ácido cítrico de un fruto de una planta de melón como se describe en esta memoria. Plantas para las cuales se amplifica un fragmento correspondiente a un rasgo de pH bajo se seleccionan y se utilizan ulteriormente.

En una realización, se obtiene una reducción de aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5 unidades de pH, en una realización aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 unidades de pH, después de la introducción del rasgo de pH bajo en una planta de *C. melo* dulce cuando se compara con frutos de un melón que no comprende el rasgo de pH bajo, por ejemplo cuando se comparan con una línea isogénica o cuasi-isogénica que no comprende el rasgo de pH bajo. En una realización, el contenido de ácido cítrico en la pulpa de una planta de melón se multiplica por un factor de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3 después de introducción de un rasgo de pH bajo en dicha planta de melón, cuando se compara con frutos de un melón que no comprenden el rasgo de pH bajo, por ejemplo cuando se comparan con una línea isogénica o cuasi-isogénica que no comprende el rasgo de pH bajo. Se comparan los frutos maduros de las diversas plantas. Por ejemplo, las Tablas 1A y 1B muestran comparaciones entre un melón que comprende un rasgo de pH bajo y melones que no comprenden un rasgo de pH bajo, por ejemplo entre YUSAZ X YUSOL, y MILENIUM-DENEV F1, SOLAZ X YUSOL y SOLAR F1, Mehari/L53 - L53 AZ A - L53 AZ B.

De acuerdo con ello, los frutos de melón de la presente invención tienen concentraciones mayores de ácidos orgánicos que melones comparables disponibles actualmente que no comprenden el rasgo de pH bajo (acidez valorable). En los frutos de melón de la presente invención, las variaciones en pH están más correlacionadas con la composición (pKa de ácidos dominantes) que con la concentración total de ácidos orgánicos. Se observa generalmente un aumento de pH durante el proceso de maduración tardía, y es concurrente con la acumulación de sacarosa. Este aumento en pH está tamponado por el contenido de ácidos orgánicos. Contenidos bajos de ácidos orgánicos dan como resultado aumentos

elevados de pH y una reducción en la percepción de sabor agrio. Por ejemplo, en melones con bajo contenido de ácido cítrico como algunos melones actualmente disponibles de tipo Charentais, por ejemplo del tipo crítico climatérico, este aumento del pH puede ser superior a 1,0 unidades de pH (desde pH 6,0 a 7,0). En contraposición, contenidos mayores de ácidos orgánicos conducen a aumentos reducidos de pH durante el proceso de maduración, y previenen o reducen así la disminución en la percepción del sabor agrio, como por ejemplo en melones menos climatéricos, menos críticos. De acuerdo con ello, la presente invención describe frutos de melón con sabor ácido agrio más estable basado en pH bajo y contenido de ácido cítrico alto estable. La presente invención describe adicionalmente frutos de melón con una estabilidad mejorada del sabor después de la maduración o posterior a la recolección. La presente invención describe también un método de retardo o reducción del aumento en el pH en el fruto de una planta de melón, que comprende aumentar el contenido de ácidos orgánicos en dicho fruto e introducir un rasgo de pH bajo en una planta de melón. Dicho método comprende introducir el rasgo de pH bajo en la planta con comportamiento poco climatérico o no climatérico, o introducir el rasgo de pH bajo en una planta capaz de producir un fruto poco crítico o no crítico.

La presente invención describe también frutos de melón, que maduran desde un sabor inicial moderadamente agrio en la maduración temprana hasta un sabor frutal y totalmente aromatizado basado en un aumento moderado del pH (hasta 0,5 unidades de pH) y contenidos moderadamente elevados de ácido cítrico.

De acuerdo con la presente invención, se introduce un rasgo de pH bajo en plantas de melón que producen frutos con diversos contenidos y composiciones de azúcares. En una realización, se utilizan como fuente de azúcares plantas del tipo Japanese-Oriental, tales como YUCA. Se observa generalmente que la acumulación de azúcares, particularmente sacarosa, es una cuestión del tiempo de ciclo del fruto entendido como días después de la polinización, desde la constitución del fruto a la maduración del fruto. En una realización, se utilizan plantas de melón que producen frutos que tienen una concentración de azúcares temprana y relevante en la presente invención. Por ejemplo, plantas del tipo Galia, tales como el cultivar OGEL, se utilizan con fuente de azúcares. En una realización, se utilizan en la presente invención plantas de melón que producen frutos que tienen potencial para una acumulación alta y rápida de sacarosa independientemente de los niveles iniciales de hexosas. Por ejemplo, plantas de tipo Charentais, tales como L53, se utilizan como fuente de dicho potencial para acumulación de sacarosa.

Ejemplos de la transferencia de un rasgo de pH bajo a líneas elite se describen en los Ejemplos más adelante. La Tabla 8 siguiente describe también plantas de melón obtenidas durante la transferencia a líneas Elite. Sin embargo, otros tipos de melones u otros cultivares o variedades de los tipos arriba mencionados se utilizan en el contexto de la presente invención para producir plantas de melón de acuerdo con la presente invención.

En una realización, una planta de *C. melo* que comprende un rasgo de pH bajo se cruza con una planta de *C. melo* del tipo Oriental o del tipo Galia. Por ejemplo, la planta de *C. melo* que comprende un gen de pH bajo es la línea IND-35. Por ejemplo, la planta de *C. melo* del tipo Oriental es YUCA, y la planta de *C. melo* del tipo Galia es OGEL, como se describe en el Ejemplo 7 más adelante. Las progenies resultantes se cruzan, por ejemplo, ulteriormente con plantas de *C. melo* del tipo Oriental o del tipo Galia para obtener el pH y composiciones de ácidos orgánicos y azúcares deseados. Este proceso está asistido por la medida de pH, ácidos orgánicos y azúcares, como se describe en esta memoria. Plantas alternativas de *C. melo* del tipo Oriental o del tipo Galia pueden rastrearse también respecto a características deseadas y utilizarse como materiales de partida para obtener plantas de *C. melo* como se describen en esta memoria.

En una realización, una planta de *C. melo* que comprende un rasgo de pH bajo se cruza con una planta de *C. melo* del tipo Charentais, tal como L53, como se describe en el Ejemplo 11. Plantas alternativas de *C. melo* del tipo Charentais pueden rastrearse también respecto a características deseadas y utilizarse como materiales de partida para obtener plantas de *C. melo* como se describen en esta memoria.

Otros tipos de plantas de *C. melo* se cruzan también con una planta de *C. melo* que comprende un rasgo de pH bajo para obtener plantas de *C. melo* como se describen en esta memoria.

La presente invención describe una planta capaz de producir un fruto, cuyas características se mantienen estables después de que un fruto alcanza la madurez y se mantiene en la planta o cuando el fruto se cosecha y se mantiene en almacenamiento, particularmente un fruto cuyas características se mantienen estables durante la vida comercial del fruto después de la cosecha. Esto permite el almacenamiento o transporte de un fruto de la presente invención durante periodos de tiempo prolongados sin pérdida de sus características organolépticas y aromas.

En una realización, el pH de un fruto de la presente invención se mantiene estable después que un fruto alcanza la madurez. El pH de un fruto de la presente invención se mantiene dentro de un intervalo de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 5,6 después de que un fruto alcanza la madurez. En una realización, el contenido de ácido cítrico de un fruto de la presente invención se mantiene estable después que un fruto alcanza la madurez. El contenido de ácido cítrico de un fruto de la presente invención se mantiene en o por encima de aproximadamente 400 mg por 100 g de pf después de que el fruto alcanza la madurez. En una realización, el contenido de ácido málico de un fruto de la presente invención se mantiene estable después de que un fruto alcanza la madurez. La relación de ácido cítrico a ácido málico de un fruto de la presente invención se mantiene estable después de que un fruto alcanza la madurez. La relación de ácido cítrico a ácido málico se mantiene superior a 4,4, particularmente superior a 5 después de que un fruto alcanza la madurez.

## ES 2 313 273 T3

Tales características se mantienen dentro de los intervalos descritos en esta memoria después que un fruto alcanza la madurez. Estas características se mantienen dentro de aproximadamente 70% a aproximadamente 130% de los valores de las características medidos cuando el fruto alcanza la madurez, particularmente dentro de aproximadamente 80% a aproximadamente 120% de los valores de las características medidas cuando el fruto alcanza la madurez, particularmente dentro de aproximadamente 90% a aproximadamente 110% de los valores de las características medidas cuando el fruto alcanza la madurez. La presente invención describe una planta capaz de producir un fruto, cuyas características se mantienen estables después de que un fruto alcanza la madurez cuando se mantiene en la planta, o cuando se cosecha y se guarda en almacenamiento. La presente invención describe una planta capaz de producir un fruto, cuyas características se mantienen estables durante al menos 2 días cuando el fruto se mantiene en la planta, en particular durante al menos 3 días cuando el fruto se mantiene en la planta, particularmente durante al menos 4 días cuando el fruto se mantiene en la planta. La presente invención describe una planta capaz de producir un fruto, cuyas características se mantienen estables durante al menos 5 días cuando se mantiene en almacenamiento a 20°C, particularmente durante al menos 7 días cuando se mantiene en almacenamiento a 20°C, particularmente durante al menos 9 días cuando se mantiene en almacenamiento a 20°C. La presente invención describe una planta capaz de producir un fruto, cuyas características se mantienen estables durante al menos 7 días cuando se mantiene en almacenamiento a 8-12°C seguido por al menos 2 días a 20°C, particularmente durante al menos 12 días cuando se mantiene en almacenamiento a 8-12°C, seguido por al menos 2 días a 20°C, particularmente durante al menos 26 días cuando se mantiene en almacenamiento a 8-12°C, seguido por al menos 2 días a 20°C. Típicamente, después de su recolección, un fruto puede permanecer en condiciones de campo durante varias horas hasta que el mismo se almacena en las condiciones indicadas en esta memoria.

Ejemplos de la evolución de las características de un fruto de una planta de la presente invención cuando se mantiene en la planta se muestran en el Ejemplo 15, Tabla 17. Ejemplos de la evolución de las características de un fruto de una planta de la presente invención después del almacenamiento después de la recolección se muestran en el Ejemplo 16, Tablas 18 y 19. Los melones pueden describirse como de duración corta (SSL), duración media (MSL) o duración larga (LSL). Ejemplos de melones LSL son Milenium, Piel de Sapo, Italo y Charentais LSL no crítico. Ejemplos de melones MSL son Galia y Charentais MSL crítico. Ejemplos de melones de duración corta (SSL) son Charentais clásicos. Típicamente, la vida de un fruto de un melón SSL en la planta es aproximadamente 1 a aproximadamente 2 días. Esto significa que los frutos tienen que recolectarse aproximadamente cada 2 días para evitar pérdidas. Típicamente, la vida de un fruto de un melón MSL en la planta es aproximadamente 3 a aproximadamente 4 días. Esto significa que los frutos se recolectan aproximadamente cada 3 a 4 días para evitar pérdidas. Típicamente, la vida de un fruto de un melón LSL en la planta es mayor que aproximadamente 5 días. Típicamente un melón SSL puede almacenarse durante aproximadamente 4 a aproximadamente 7 días a 8-12°C, seguido por 2 días adicionales a 20°C, o durante aproximadamente 3 a 4 días a 20°C. Típicamente, un melón MSL puede almacenarse durante aproximadamente 7 a aproximadamente 12 días a 8-12°C, seguido por 2 días adicionales a 20°C, o durante aproximadamente 5 a 10 días a 20°C. Típicamente un melón LSL puede almacenarse durante más de aproximadamente 12 días a 8-12°C seguido por 2 días adicionales a 20°C, o durante más de aproximadamente 10 días a 20°C.

En una realización, una planta de la presente invención es capaz de producir un fruto de duración larga (LSL) o un producto de duración media (MSL).

Los autores de la presente invención han determinado que el rasgo de pH bajo y el ácido cítrico alto acelera la subida climatérica en un fruto de melón después que un fruto alcanza la madurez, especialmente en melones críticos y climatéricos. Esto conduce a la degradación del fruto, por ejemplo mostrada por un aumento rápido en el pH y contenido de ácido málico y una disminución en el contenido de ácido cítrico. Esto se muestra también por la aparición de textura harinosa y degradación alcohólica. En los melones críticos y climatéricos, la duración del fruto se reduce, mientras que este fenómeno es menos perceptible en los melones no críticos y/o no climatéricos. De acuerdo con ello, en una realización, una planta de la presente invención es de un genotipo de melón no crítico o poco crítico. En una realización, una planta de la presente invención es capaz de producir un fruto no climatérico o poco climatérico.

De acuerdo con ello, en una realización, la presente invención describe una planta de *C. melo* con comportamiento climatérico bajo o no climatérico que comprende un gen de pH bajo. En una realización, un fruto de una planta de *C. melo* de este tipo comprende adicionalmente la característica de contenidos y composiciones de azúcares descrita en esta memoria. En una realización, un fruto de una planta de *C. melo* de este tipo comprende la característica de contenidos y composiciones de ácidos orgánicos descritos en esta memoria. En una realización, un fruto de una planta de *C. melo* de este tipo comprende una relación de ácido cítrico a ácido málico como se describe en esta memoria. En una realización, un fruto de dicha planta comprende adicionalmente un pH como se describe en esta memoria.

En una realización, la presente invención describe una planta de *C. melo* capaz de producir un fruto poco crítico o no crítico, en donde dicha planta comprende un gen de pH bajo. En una realización, un fruto de una planta de *C. melo* de este tipo comprende adicionalmente la característica de contenidos y composiciones de azúcares descritos en esta memoria. En una realización, un fruto de una planta de *C. melo* de este tipo comprende adicionalmente la característica de contenidos y composiciones de ácidos orgánicos descritos en esta memoria. En una realización, un fruto de una planta de *C. melo* de este tipo comprende una relación de ácido cítrico a ácido málico como se describe en esta memoria. En una realización, un fruto de una planta de este tipo comprende adicionalmente un pH como se describe en esta memoria.

## ES 2 313 273 T3

5 En una realización, los autores de la presente invención han identificado que un pH bajo en la pulpa de un fruto de melón está asociado con una intensidad de color muy pobre de la pulpa de los frutos con pulpa naranja. En particular, en el caso de plantas de melón que producen fruto con pulpa naranja, se observó un color ligeramente naranja o naranja pálido (véase v.g. la Tabla 4). Sorprendentemente, los autores de la presente invención han sido capaces de combinar el pH bajo y el color naranja intenso en el fruto de una planta de melón.

10 La Tabla 4 muestra que la intensidad del color de los frutos de la línea L53, un parental de MEHARI híbrido Syngenta, es naranja intenso a muy intenso (valor medio de 5,17). Las plantas originarias de un programa de retrocruzamiento para introducir el rasgo de pH bajo en L53 pero que no comprendía el rasgo de pH bajo (L53\*pH alto) exhibían una ligera disminución tanto en intensidad de color como en pH (4,71 y 6,46). Las plantas originarias del programa de retrocruzamiento y que comprendían el rasgo de pH bajo exhibían una disminución adicional en intensidad de color y pH. Las plantas con rasgos de pH bajo en la etapa homocigótica (L53\*pH bajo), tenían la tasa mínima para el color naranja de la pulpa: 4,04. Las plantas con rasgo de pH bajo en la etapa heterocigótica (L53\*ácido) tienen la tasa intermedia para el color naranja de la pulpa: 4,36. Esto indica un enlace o efecto fenotípico entre pH bajo y el color naranja pálido de la pulpa.

20 Las plantas se seleccionaron por ello respecto a color naranja intenso de la pulpa en presencia del rasgo de pH bajo (evaluado en una realización en 4 o mayor en la escala indicada más adelante, en una realización en 5 y mayor, en una realización en 6).

25 En una realización, los autores de la presente invención describen una planta de *C. melo* capaz de producir fruto con pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,6, en donde dicho fruto tiene una pulpa naranja evaluada en 4 o mayor. En una realización, el color naranja de dichos frutos se evalúa en 5 o mayor, en una realización en 6. En una realización, el pH de dicho fruto es aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,4; en una realización aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,2. En una realización, dicho fruto comprende aproximadamente 400 mg a aproximadamente 900 mg de ácido cítrico por 100 g de pf. En una realización, el fruto comprende aproximadamente 450 mg a aproximadamente 750 mg de ácido cítrico por 100 g de pf. En una realización, dicho fruto comprende un contenido de azúcar igual o superior a aproximadamente 5 g por 100 g de pf; en una realización, aproximadamente 5,0 g a aproximadamente 13,0 g de azúcar por 100 g de pf. En una realización, el fruto comprende aproximadamente 6,0 g a aproximadamente 12,0 g de azúcar por 100 g de pf. En una realización, la relación de ácido cítrico a ácido málico en dicho fruto está comprendida entre aproximadamente 4 y 30; en una realización entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15. En una realización, la relación de sacarosa a hexosas en un fruto de dicha planta es aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:2.

35 Una escala de: 1: blanco, 2: ligeramente naranja, 3: naranja pálido, 4: naranja, 5: naranja intenso, 6: naranja muy intenso, se utilizó para la evaluación del color (véase la Tabla 4). En una realización, el color del fruto se evalúa utilizando un espectrofotómetro, tal como un espectrofotómetro Minolta CM-2500d.

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

# ES 2 313 273 T3

TABLA 4

		<u>Clase de intensidad de color de la carne % por</u>					
		Anaranjado pálido			Anaranjado intenso		
		2	3	4	5	6	Promedio de color
No. de Frutos							
5	L53 auténtico				83%	17%	5,17
14	L53*pH alto			29%	71%		4,71
91	L53*ácido	0%	7%	55%	34%	4%	4,36
244	L53*pH bajo	2%	19%	48%	27%	3%	4,04

  

		<u>Valor medio de pH para la clase de intensidad de color de la carne</u>					
		Anaranjado pálido			Anaranjado intenso		
		2	3	4	5	6	Promedio de pH
No. de Frutos							
5	L53 auténtico				6,90	6,64	6,85
14	L53*pH alto			6,28	6,53		6,46
91	L53*ácido		4,75	4,81	4,87	4,94	4,83
244	L53*pH bajo	4,53	4,64	4,76	4,73	4,65	4,72

L53\*ácido\*: significa homocigotos fijos de pH bajo demostrados, excluido el fenotipo ácido

En una realización, las características de frutos de melón de la presente invención se miden en frutos recogidos en la madurez, es decir, frutos maduros o en su punto. La composición concreta de un fruto de melón, y por tanto su sabor, se ve afectada por la etapa de maduración, en la cual se recolecta el mismo. Los azúcares y la acumulación de ácidos orgánicos en los frutos de melón son procesos dinámicos. A medida que el fruto se aproxima a la madurez se inicia su acumulación. A medida que avanza el proceso de maduración, cada uno de estos compuestos sigue un patrón específico de tiempo de acumulación o degradación, que se ve también afectado por condiciones ambientales y de desarrollo. La persona experta en la técnica sabe el modo de reconocer un fruto de melón maduro y comprende los criterios que definen la madurez de un fruto de melón. Uno de los marcadores de la madurez externos siguientes se utiliza para identificación de la maduración en el melón dulce:

- senescencia de la hoja lateral del fruto de melón (el fruto de melón se asienta en la flor axilar a la inserción del pedúnculo de una hoja denominada hoja lateral del fruto). La hoja lateral del fruto se vuelve necrótica.

## ES 2 313 273 T3

- El color de la piel del fruto cambia (cambiando de color verde a amarillo en el tipo Galia, gris a amarillo crema en el tipo Charentais, o aumento en el componente amarillo en el tipo Piel de Sapo).
- Dehiscencia del pedúnculo (especialmente para el melón Shipper, menos para Charentais, menos para Galia).
- Disminución en la consistencia de la cáscara del fruto, particularmente en la zona del extremo de la inflorescencia.

“Madurez” incluye el proceso fisiológico de maduración entre las etapas identificadas como “2” para “madurez parcial temprana” y “4” para “madurez total tardía”. La etapa de madurez parcial temprana en los melones se identifica con la acumulación inicial de contenidos de sacarosa de 2 g por 100 g de pf de sacarosa o más. Esto está asociado con el alcance de los valores pico de ácido cítrico y contenidos de azúcares reductores (glucosa más fructosa) y pigmentos y textura de la pulpa del fruto maduro típicos. La etapa totalmente madura tardía en los melones se define con el final de los valores pico de contenidos de azúcares sacarosa. La misma se define también como antes de comenzar el proceso de degradación, tal como la pérdida de consistencia de la pulpa del fruto, disminuciones rápidas en los contenidos de glucosa y ácido cítrico o aumentos en los contenidos de ácido málico. De acuerdo con ello, la madurez de un fruto comienza cuando el contenido de sacarosa en el fruto alcanza 2 g por 100 g de pf. La madurez dura hasta que ya no se observa más aumento en el contenido de sacarosa.

Las medidas descritas en esta memoria son usualmente para valores medios de medidas o datos tomados de cierto número de frutos. Debe entenderse que, en cualquier muestra, los frutos individuales de una planta o frutos de plantas individuales no están comprendidos dentro de los intervalos descritos, debido a variaciones observadas generalmente cuando se cultivan plantas de melón. Las características de los frutos de melón descritos en esta memoria se miden utilizando frutos cultivados en las condiciones descritas en esta memoria o en condiciones similares (v.g. en el Ejemplo 6, Tablas 5-7 siguientes). En una realización, una cifra para una característica de acuerdo con la presente invención es un valor medio tomado de frutos cultivados de plantas marcadas en invernadero (un fruto por planta en las plantas marcadas).

En una realización, una planta de la presente invención es una línea endogámica, un dihaploide o un híbrido. En una realización, una línea endogámica comprende un rasgo de pH bajo y las características de ácidos orgánicos, pH y azúcares descritas en esta memoria. En este caso, dicha línea endogámica está cruzada con otra planta de melón, preferiblemente otra línea endogámica, para obtener una planta híbrida de acuerdo con la presente invención. En una realización, la otra línea endogámica en el cruce es capaz también de producir un fruto que tiene contenidos elevados de ácido cítrico y/o contenidos elevados de azúcares. Líneas endogámicas representativas de acuerdo con la presente invención se describen en la Tabla 1A.

En una realización, una planta de la presente invención es una planta híbrida. En este caso, algunas de las características de pH bajo, contenido elevado de ácido cítrico y contenido elevado de azúcares son aportadas por uno de los parentales, mientras que las características restantes son aportadas por el otro parental. En una realización, un parental en el cruce produce fruto que tiene contenido elevado de ácido cítrico, contenido elevado de azúcares, pero que tiene pH alto (v.g. aproximadamente alrededor de pH 6,5), mientras que el otro parental en el cruce produce un fruto que tiene pH bajo. En una realización, los frutos del otro parental tienen también contenido elevado de ácido cítrico. Híbridos representativos de acuerdo con la presente invención se describen en la Tabla 1B. Como se utiliza en esta memoria, el término “planta” incluye células de plantas, protoplastos de plantas, cultivo de células o tejidos de plantas a partir de los cuales pueden regenerarse plantas de melón, callos de planta, matas de planta, y células de plantas que están intactas en plantas o partes de plantas, tales como polen, flores, hojas, tallos, y análogos. En una realización, una planta de la presente invención es capaz de producir frutos de melón comestibles. El mesocarpio representa la parte comestible del fruto de melón (pulpa). El mesocarpio rodea la cavidad de las semillas, que está rodeada a su vez por la piel (o cáscara). El mesocarpio de un fruto de acuerdo con la presente invención tiene preferiblemente un espesor mayor que 2 cm y, preferiblemente, representa más del 50% del peso total del fruto fresco. En una realización, la pulpa de un fruto de una planta de melón de la presente invención tiene una pulpa verde, blanca, amarilla o naranja.

La presente invención proporciona células regenerables para uso en cultivo de tejidos de una planta de la presente invención. El cultivo de tejidos es capaz de regenerar plantas que tienen las características de una planta de la presente invención. Preferiblemente, las células regenerables en tales cultivos de tejidos son embriones inmaduros, protoplastos, células meristemáticas, callo, polen, hojas, anteras, raíces, puntas de raíz, o flores. Todavía adicionalmente, la presente invención proporciona plantas de melón regeneradas a partir de los cultivos de tejidos de la invención. Ejemplos de protocolos de regeneración se describen en el documento US 6.420.631. La presente invención proporciona además un método de propagación asexual de una planta de la presente invención que comprende recoger un tejido de una planta de la presente invención, cultivar dicho tejido para obtener vástagos proliferados, y enraizar dichos vástagos proliferados para obtener plántulas enraizadas. La presente invención describe adicionalmente un método para producir semillas de una planta de acuerdo con la presente invención, que comprende obtener una planta de la presente invención, autopolinizar dicha planta o cruzar dicha planta con otra planta de melón, y recolectar las semillas de la progenie. La presente invención describe adicionalmente un método para producir un fruto, que comprende plantar una planta de acuerdo con la presente invención, cultivar dicha planta y recolectar un fruto, en donde dicho fruto comprende las características descritas en esta memoria. El método comprende adicionalmente almacenar dicho fruto,

## ES 2 313 273 T3

por ejemplo como se describe en esta memoria. El método comprende adicionalmente transportar dicho fruto. Las características de dicho fruto descritas en esta memoria se mantienen estables durante el almacenamiento de dicho fruto. Las características de dicho fruto descritas en esta memoria se mantienen estables durante el almacenamiento de dicho fruto.

5

Algunas características de cierto número de tipos y líneas de *C. melo* se describen a continuación. Estas características son ejemplos de los diversos tipos y líneas de melón, y no deben de entenderse como limitantes, sino como ilustrativas de los diversos tipos y líneas de melón. Pueden presentarse variaciones de estas características.

### 10 Melón tipo Charentais:

Fruto: forma redonda a redonda alta; tamaño 600 a 1200 g; corteza: suturas blanca-gris a verde-gris, piel lisa (piel lisa o ligeramente reticulada). Pulpa naranja, blanda, dulce y muy aromática, climatérica. Algunas variedades Charentais tienen fase climatérica reducida y color de piel no crítico.

15

Var LUNASTAR: lunastaz es un híbrido monoecio de Nunhmes en tipo Charentais.

### Melón tipo Japones:

20 Fruto: forma redonda a redonda alta; tamaño 700 a 1500 g; Corteza: piel reticulada blanca-gris, (excepcionalmente suturada). Verde-amarilla (excepcionalmente naranja), pulpa de crujiente a blanda y poco aromática y muy dulce, solamente en algunos casos. Ciclo largo no climatérico.

25

Var. YUCA: híbrido andromonoecio en la pulpa verde de tipo japonés.

Var. PRINCE: híbrido andromonoecio en la pulpa naranja de tipo japonés.

### Melón tipo Galia:

30 Fruto: forma redonda a redonda alta; tamaño 600 a 1500 g. Corteza: piel amarilla con tonalidad verde reticulada. Carne verde-blanca, blanda, aromática y dulce. Duración media de ciclo corto, climatérico.

Var. MG. 755: híbrido andromonoecio en tipo Galia. Ciclo del fruto muy corto con Brix alta.

35

### Melón tipo Piel de sapo:

Fruto: forma ovoide a oblonga-elíptica; tamaño: 2 a 5 kg; corteza: dorada-verde moteada, piel poco reticulada longitudinal. Pulpa blanca, crujiente, jugosa y aromática dulce. Ciclo de fruto medio con duración larga, no climatérico.

40

Var. Sancho: híbrido andromonoecio en tipo piel de sapo. Corteza dorada con Brix alta.

### Melón tipo Faggous:

45 Fruto: forma cilíndrica media-corta; tamaño 300 a 1000 g; corteza: piel verde. Carne blanca, crujiente, no dulce. Para consumo verde en ensalada, monoecio.

### IND35:

50 Fruto: forma larga de pera-ovoidea; tamaño 300 a 1000 g; corteza: piel verde moteada en verde claro, amarilla en la madurez. Carne blanca, crujiente y no dulce. Para consumo verde en ensalada. Monoecio, línea de Syngenta Seeds, no climatérico.

### YUSOL:

55 Forma redonda a redonda alta; tamaño 600 a 1300 g; Corteza: piel amarilla poco reticulada con suturas verde claro. Carne verde-blanca, blanda, poco aromática dulce y no ácida. Ciclo corto de duración media, no crítico y poco climatérico. Línea de semillas Syngenta andromonoecia.

60 YUSAZ A: Forma redonda a redonda alta; tamaño 600 a 1300 g; Corteza: piel gris poco reticulada con suturas verde-gris. Pulpa verde, especialmente crujiente, poco aromática, dulce y ácida. Duración media-larga de ciclo corto, no crítico, poco climatérico a climatérico medio. Línea de Syngenta Seeds andromonoecia.

65 YUSAZ B: Forma redonda a redonda alta; tamaño 600 a 1300 g; Corteza: piel amarilla reticulada con suturas verde-gris. Pulpa verde, especialmente crujiente, poco aromática, dulce y ácida. Ciclo largo, duración larga, no crítico y poco climatérico. Línea de Syngenta Seeds andromonoecia.

## ES 2 313 273 T3

### MILENIUM-DENEV:

5 Forma redonda a redonda alta; tamaño 600 a 1500 g; Corteza: piel amarilla reticulada no suturada. Pulpa verde-blanca, crujiente, no aromática, no ácida y dulce. Ciclo largo, no crítico, duración larga, no climatérico. Híbrido de Syngenta Seeds andromonoecio.

### SOLAZ/1:

10 Forma redonda a redonda alta; tamaño 700 a 1400 g; Corteza: amarilla poco reticulada con piel de suturas verde claro. Pulpa blanca, crujiente, dulce, poco aromática y ácida. Ciclo corto, duración larga, no crítico, muy poco climatérico. Línea de Syngenta Seeds andromonoecia.

### SOLAZ/2:

15 Forma redonda a redonda alta; tamaño 600 a 1300 g; Corteza: amarilla poco reticulada con piel de suturas verde claro. Carne blanca, crujiente, poco aromática dulce y ácida. Ciclo corto, duración larga, no crítico, muy poco climatérico. Línea de Syngenta Seeds andromonoecia.

### MEHARI:

20 Híbrido monoecio de Syngenta en tipo Charentais. Duración media crítica.

### L53:

25 Línea andromonoecia de Syngenta en tipo Charentais. Duración media crítica. Forma redonda aplastada de tamaño pequeño. Derivado de var. LUNASTAZ, un híbrido monoecio de Nunhems en tipo Charentais crítico.

### TD:

30 Línea monoecia de Syngenta de tipo Charentais. No crítico y duración larga. Derivado de var. TORNADO, un híbrido monoecio de Limagrain en tipo Charentais no crítico.

35 Todas las referencias citadas en esta memoria se incorporan por referencia en la solicitud en sus totalidades. Cuando se describen intervalos en esta memoria, debe entenderse que todos los números individuales que caen dentro de estos intervalos forman también parte de la invención.

40 Los ejemplos siguientes tienen por objeto proporcionar ilustraciones de la aplicación de la presente invención. Los ejemplos siguientes no tienen por objeto definir completamente o limitar de ningún otro modo el alcance de la invención.

### **Ejemplos**

#### Ejemplo 1

45 *Preparación de extractos de melón*

50 Se tomó una porción de aprox. 400 g de un fruto de melón, y se retiraron las semillas y la piel (1 cm de espesor). Se cortó la pulpa en pequeños trozos, que se mezclaron durante 30 segundos en una mezcladora Warring hasta que se obtuvo una pasta suave. La pasta se filtró a través de un papel de filtro Whatman, se centrifugó el zumo en una centrifugadora Eppendorf a 10.000 g y se almacenó a -20 grados Celsius.

#### Ejemplo 2

55 *Determinación del contenido de ácido cítrico*

60 Muestras tal como se prepararon en el Ejemplo 1 se incubaron con citrato-liasa (CL) para convertir el ácido cítrico en oxaloacetato y acetato. En presencia de las enzimas malato-deshidrogenasa (MDH) y lactato-deshidrogenasa (LDH), el oxaloacetato y su derivado descarboxilado piruvato se redujeron con NADH a, respectivamente, L-malato y L-lactato. La disminución de NADH es proporcional a la cantidad de ácido cítrico en la muestra, y puede determinarse a 340 nm. El ensayo se realizó en microplacas. Se añadieron 20  $\mu$ l de muestra diluida a una placa de microtitulación. Se añadieron 200  $\mu$ l de mezcla de ensayo que contenía NADH, MDH y LDH, y se mezclaron en la placa. La reacción se inició con 15  $\mu$ l de solución de partida que contenía CL. La placa se mezcló y se dejó que la reacción transcurriera durante 1 hora. Se midieron los valores de absorbancia a 340 nm con un lector de placas de microtitulación (lector Biotek EL808 con software y ordenador KCJunior). Se utilizó una curva de calibración para calcular la concentración de ácido cítrico en las muestras. Las enzimas se adquirieron de Roche Diagnostics.

## ES 2 313 273 T3

### Ejemplo 3

#### *Determinación del contenido de ácido málico*

5 Muestras como se prepararon en el Ejemplo 1, se incubaron con L-malato-deshidrogenasa (MDH) y  $\text{NAD}^+$  para convertir L-malato en oxaloacetato. El equilibrio de la reacción está desplazado al lado del malato, pero se forzó hacia el lado del oxaloacetato con hidrazina por medio de derivatización. La NADH formada durante el ensayo es proporcional al contenido de ácido málico en las muestras. La NADH puede determinarse a 340 nm como medida del ácido málico.

10

El ensayo se realizó en microplacas. Se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de muestra diluida a una placa de microtitulación. La reacción se inició por adición de 200  $\mu\text{l}$  de mezcla de ensayo que contenía hidrazina, MDH y  $\text{NAD}^+$  a pH 10. La placa se mezcló y la reacción se dejó transcurrir durante 1 hora. Los valores de absorbancia se midieron a 340 nm con un lector de placas de microtitulación (lector Biotek EL808 con software y ordenador KCJunior). Se utilizó una curva de calibración para calcular la concentración de ácido málico en las muestras. La MDH se adquirió de Roche Diagnostics.

15

### Ejemplo 4

#### *Determinación de los contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa*

20

##### Glucosa:

Se determinó la glucosa con las enzimas hexoquinasa y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G-6-PDH). La glucosa se fosforiló con hexoquinasa a glucosa-6-fosfato (G-6-P) y se deshidrató subsiguientemente a 6-fosfogluconato con ayuda de NADP y G-6-PDH (reacciones 1 y 2, respectivamente). La concentración de NADPH formada (el aceptor de H) está relacionada cuantitativamente con la concentración inicial de glucosa y se midió a 340 nm en el intervalo UV del espectro luminoso.

25

##### Fructosa:

30

La fructosa se determinó en el mismo ensayo. La fructosa se fosforiló a fructosa-6-fosfato (F-6-P) con la enzima hexoquinasa. F-6-P se convirtió en G-6-P con la enzima fosfogluconato-isomerasa (PGI) y subsiguientemente en 6-PG como se describe en la reacción 2 anterior.

##### Sacarosa:

35

La sacarosa se convirtió en glucosa y fructosa con la enzima  $\beta$ -fructosidasa. La glucosa formada se determinó de acuerdo con las reacciones 1 y 2 como se ha descrito arriba.

40

Las determinaciones se realizaron en placas de microtitulación, y los valores de la absorbancia se miden con un lector de placas de microtitulación (Biotek ELx808 con software y ordenador para recogida de los datos). Las enzimas se adquirieron de Roche Diagnostics.

### Ejemplo 5

#### *Medidas de pH*

El pH de las muestras como se describe en el Ejemplo 1, se determinó utilizando un medidor del pH CRIMSON GLP21 calibrado a pH 4 y pH 7 con soluciones estándar.

50

### Ejemplo 6

#### *Condiciones de crecimiento de las plantas de melón*

55

Las plantas de melón se cultivaron en condiciones diferentes y en localizaciones diferentes (véase la Tabla 5 siguiente). Los datos de las pruebas se presentan en la Tabla 6 y las condiciones de crecimiento en las diferentes pruebas se describen en la Tabla 7.

60

65

Tabla 5: descripción de las pruebas

	LOCALIZACION		EN		TIPO DE COSECHA			CONDICIONES			SUSTRATO	
	ESPAÑA	Es. E.	Es. E.	EL	POLINIZACION POR ABEJAS DE LA VID	POLINIZACION MANUAL APILADA	CAMPO ABIERTO	INVERNADERO	SUELO	HIDROPONICO		
FA02PS			X			X		X		X		
SP03PV			X		X			X				
SP03PS			X			X		X		X		
SP03OF	X				X		X		X			
SU03PS			X			X		X		X		
FA03PS			X			X		X		X		

FA: otoño, SP: primavera, SU: verano, PS: cultivo marcado en invernadero, PV: cultivo de vid de invernadero

Tabla 6: Fechas de las pruebas

FECHAS DE LAS PRUEBAS	SIEMBRA	TRASPLANTE	PRIMERA POLINIZACION	RECOLECCION MEDIA
FA02PS	1/8/2002	19/8/2002	1/9/2002	30/10/2003
SP03PV	18/1/2003	18/2/2003	4/4/2003	15/5/2003
SP03PS	18/2/2003	18/3/2003	18/4/2003	30/5/2003
SP03OF	10/3/2003	11/4/2003	20/5/2003	28/6/2003
SU03PS	24/7/2003	8/8/2003	20/8/2003	6/10/2003
FA03PS	7/8/2003	22/8/2003	8/9/2003	3/11/2003

En este caso, SP03OF1 se refiere a los datos analíticos de los frutos recolectados el 20 de junio de 2003. SP03OF2 se refiere a los frutos recolectados el 4 de julio de 2003.

Tabla 7A: Condiciones de desarrollo para FA02PS

Localización: E. Es. EL Ejido  
Invernadero

Semana No. 2002	29/30/31/32	33/34/35/36	37/38/39/40	41/42/43/44	45/46/47/48
Temperatura- día	31,5	31	28,6	22,4	18,4
Temperatura-noche	25	23,1	22,4	17,8	14,4
Temperatura-24 horas	28,8	27,4	25,5	19,8	18
Humedad relativa- día, %	51	47	55	78	84
Humedad relativa- noche, %	73	72	78	89	90
Humedad relativa- 24 h, %	60	69	66	84	88

Las semanas se enumeran comenzando el 1 de enero, siendo la semana 29 la semana 29ª del año.

Tabla 7B: Condiciones de desarrollo para SP03PV, SP03PS, SU03PS, FA03PS

Localización: Es. E. El Ejido, INVERNADERO

Semana No. 2003	1/2/3/4	5/6/7/8	9/10/11/12	13/14/15/16	17/18/19/20	21/22/23/24	25/26/27/28	29/30/31/32
Temperatura-día	15,9	16,7	25,1	26,9	26,9	31,2	37,4	37,1
Temperatura-noche	10,4	11,1	17,9	20,3	21,9	25,6	28,6	28,5
Temperatura-24 horas	12,6	13,5	21,4	23,8	24,8	28,9	33,9	33,5
Humedad relativa-día, %	71	59	46	53	63	54	38	32
Humedad relativa-noche, %	91	83	64	68	73	67	57	46
Humedad relativa-24 h, %	83	73	55	61	67	59	45	38

Localización: Es. E. El Ejido, INVERNADERO

Semana No. 2003	33/34/35/36	37/38/39/40	41/42/43/44	45/46/47/48
Temperatura-día	30,9	25,3	20,8	19
Temperatura-noche	25,1	21,8	17,9	15
Temperatura-24 horas	28,3	23,6	19,2	16,7
Humedad relativa-día, %	60	82	89	86
Humedad relativa-noche, %	80	89	96	99
Humedad relativa-24 h, %	69	86	92	93

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Tabla 7C: Condiciones de desarrollo para SP03OF  
Es. E. TORREPACHECO.  
CAMPO ABIERTO

Semana No. 2003	9/10/11/12	13/14/15/16	17/18/19/20	21/22/23/24	25/26/27/28
Temperatura máx.	28,0	36,0	34,0	33,0	37,0
Temperatura máx. media	19,9	26,2	27,0	28,0	34,5
Temperatura media	14,3	20,1	19,9	22,1	27,1
Temperatura mín. media	8,8	14,0	12,7	16,2	19,7
Temperatura mín.	5,0	8,0	9,0	12,0	17,0

## ES 2 313 273 T3

### Ejemplo 7

#### *Transferencia del rasgo de pH bajo a líneas elite*

- 5 1. La línea IND-35 se cruzó con una serie seleccionada de líneas elite Syngenta en la estación de pruebas de El Ejido (España).

Las líneas seleccionadas fueron:

- 10 a) .- YUCA-15: Se seleccionó debido a su alto potencial para acumulación de azúcares en ciclo medio-largo (tiempo desde la constitución del fruto a la maduración del fruto). YUCA es una línea de Syngenta Seeds patentada obtenida a lo largo de 5 generaciones de autopolinización. Es un tipo de melón japonés Rocky, no crítico y muy poco climatérico.
- 15 b) .- OGEL-17: Se seleccionó debido a su ciclo medio-corto (tiempo desde la constitución del fruto a la maduración del fruto) y potencial medio-alto para acumulación de azúcares. Esta línea es una línea de Syngenta Seeds patentada obtenida a lo largo de 10 generaciones de autopolinización a partir de una progenie F1 procedente del cruce entre líneas parentales de los híbridos comerciales GUSTAL y RADICAL (Syngenta Seeds). Es un melón de tipo GALIA, crítico y climatérico medio.

20

Los cruces de F1 produjeron una generación de descendientes F2 autopolinizados. Los frutos F2 se seleccionaron para pH y azúcar bajo (Tabla 8A).

- 25 2. Ambas poblaciones F2 se cultivaron y se sometieron a polinización cruzada planta por planta con una nueva serie seleccionada de líneas elite de Syngenta:

- 30 a) .- IND-35/YUCA-15: La población F2 se cruzó con *MG.755-68 (755)*, una línea de Syngenta Seeds patentada obtenida a través de 5 generaciones de autopolinización a partir de un híbrido comercial BETULO (Syngenta Seeds). Es un melón GALIA crítico y climatérico medio de tipo seleccionado para el propósito debido a su pulpa verde, alto contenido en azúcares, ciclo corto y contenido relativamente alto de ácido cítrico.
- 35 b) .- IND-35/OGEL-17: La población de F2 se cruzó con *SEN19C8 (SN8)*. Esta línea es una línea patentada de Syngenta Seeds, no crítica y muy poco climatérica, obtenida a lo largo de 6 generaciones de autopolinización de un híbrido comercial EARLS SEINU (Yae Nogeey Seeds Co. Isahaya, Nagasaki, Japón). Es un tipo de melón japonés Rocky seleccionado para el propósito debido a su alto contenido en azúcares y reticulación.

40 En estas poblaciones, se verificó la regulación genética de dominancia simple para el rasgo de pH bajo, así como que no existía enlace alguno entre la acumulación de azúcar y dicho pH bajo. (Tabla 3). A partir de cada población (150 plantas en cada caso), se seleccionaron recombinantes que incluían el grado R.I. Brix más alto y el pH más bajo. Se recogió la progenie de semillas autopolinizada. Las progenies cruzadas seleccionadas de la población a) de F2 incluían las plantas identificadas como: 755YUCIND-19, 755YUCIND-49, Y 755YUCIND-75.

45 La progenie seleccionada a partir de la población b) de F2 incluía la variante identificada como:

SN8OGLIND-03.

50 Se seleccionaron líneas 755YUCIND para acumulación de sacarosa. Se seleccionó SN8OGLIND para la acumulación de ácido cítrico. Estas progenies cruzadas se desarrollaron y se produjeron datos para pH, contenidos en azúcares y en ácidos orgánicos. Se seleccionaron las líneas que combinaban altos contenidos en azúcares, bajo pH y contenido elevado de ácido cítrico. El análisis de las plantas seleccionadas se muestra en la Tabla 8B.

55

60

65

Tabla 8 A: Análisis de los compuestos intermedios

Tabla 8A: Extracto de datos analíticos para plantas seleccionadas en F2 (Agadir, otoño 1998)

HEMBRA	pH	Brix	Genotipo
YUCA-15.071.xIND35-1)-49.	4.30	13.0	Aa
YUCA-15.071.xIND35-1)-75.	4.10	12.4	Aa
YUCA-15.071.xIND35-1)-19.	4.05	10.4	AA
OGEL-17.974.xIND35-1)-03.	4.57	11.8	Aa

Tabla 8B: Extracto de datos analíticos para la progenie de B1F1 (El Ejido, primavera, 1999)

Macho	Hembra	pH	Ácido cítrico	Ácido málico (mg/100 g)	Glucosa (g/100 g)	Fructosa (g/100 g)	Sacarosa (g/100 g)	Azúcar total (g/100 g)	Brix R.I..	Nº Frutos
		4,7	773	52	2,3	2,4	1,7	6,3	10,0	
		4,5	930	48	1,8	2,0	4,4	8,2	12,0	
SN8	OGLIND-03	4,7	809	56	2,0	2,2	2,4	2,4	10,2	5
		5,0	540	45	2,6	2,7	1,7	6,9	10,0	
		5,0	619	39	1,7	2,4	3,3	7,4	11,5	
755	YUCIND-49	4,8	535	67	2,0	2,5	1,8	6,3	9,9	5
		5,0	549	38	2,5	2,7	2,7	7,9	12,0	
		5,4	564	52	2,6	2,7	2,2	7,4	11,0	
755	YUCIND-75	5,3	568	40	2,3	2,5	2,6	7,5	10,7	3
		5,5	624	44	1,5	2,2	4,5	8,2	12,0	
		4,7	648	53	1,9	2,0	3,7	7,6	13,0	
755	YUCIND-19	5,1	569	44	1,7	2,1	3,3	7,2	11,1	8

Tabla 8C: Extracto de datos analíticos para la progenie de B2 y 3F1 (El Ejido, otoño 1999)

Macho	Hembra	pH	Ácido cítrico (mg/100 g)	Glucosa (g/100 g)	Fructosa (g/100 g)	Sacarosa (g/100 g)	Azúcar total (g/100 g)	Brix R.I..	Nº Frutos
		4,7	802	2,5	2,5	2,9	7,9	12,5	
		4,7	1036	2,3	2,4	3,7	8,4	14,5	
		5,1	594	2,5	2,6	2,4	7,4	12,0	
IOTYU	SN8 OGLIND-03	4,7	771	2,3	2,4	2,4	7,1	12,6	9
755	755 YUCIND-19								
YUCA64	755)2 YUCIND-19								

Tabla 8D: Extracto de datos analíticos para la progenie de B3F1 y 2 (Torrepacheco, primavera 2000)

Macho	Hembra	pH	Ácido cítrico (mg/100 g)	Glucosa (g/100 g)	Fructosa (g/100 g)	Sacarosa (g/100 g)	Azúcar total (g/100 g)	Brix R.I..	Nº Frutos
SOLAR-19	IOTYU SN8 OGLIND-03								
SOLAR-19	IOTYU SN8 OGLIND-03	4,14	725	1,9	1,8			15,0	13
IOTYU	IOTYU SN8 OGLIND-03	4,73	523	1,8	1,2			14,3	3
	YUCA64 755)2 YUCIND-I9	4,87	566	2,3	1,7			14,7	3

Tabla 8E: Extracto de datos analíticos (El Ejido, otoño 2000)

Macho	Hembra	pH	Ácido cítrico (mg/100 g)	Glucosa (g/100 g)	Fructosa (g/100 g)	Sacarosa (g/100 g)	Azúcar total (g/100 g)	Brix R.I..	Nº Frutos
	SOLAZ4.4.4	4,32	573	3,0	1,2			7,0	
	SOLAZ4.7.2	4,44	564	3,3	1,1			11,0	
	SOLAZ2.4.2	4,52	494	2,9	1,4			11,0	
	SOLAZ2.4.5	4,43	474	2,7	1,0			10,0	
YUCA-40	IOTYU)2 SN8 OGLIND-03	4,48	453	2,5	1,0			12,0	
	YUCA64 755)2 YUCIND-19	4,79	904	4,8	1,8			13,0	

Tabla 8F: extracto de datos analíticos (El Ejido, 2001)

Macho	Hembra	pH	Ácido cítrico (mg/100 g)	Glucosa (g/100 g)	Fructosa (g/100 g)	Sacarosa (g/100 g)	Azúcar total (g/100 g)	Brix R.I..	Nº Frutos
	SOLAZ 1	4,59	940	2,3	2,9	4,1	9,4	11,0	
	SOLAZ 2	4,63	770	2,5	2,7	1,3	6,6	8,0	
YLTSOL27	YUCA-40 IOTY SNC8OGLIN U)2 D-03	4,6	741	3,4	2,5	4,8	10,4	14,0	
YUSOL27	YUCA-64 755)2 YUCIND-19	5,05	467	2,5	2,6	5,0	10,1	12,0	
L53	755 YUCIND-75	4,80	718	1,3	2,2	1,6	5,1	7,0	
L53	755 YUCIND-49	4,68	673	2,5	2,7	2,3	7,6	9,0	

## ES 2 313 273 T3

### Ejemplo 8

#### *Introgresión de los rasgos en SOLAZ*

5 El rasgo de pH bajo se introgresó en pulpa blanca de melones LSL no climatéricos con forma redonda y piel suturada amarilla.

10 1. Las plantas de la progenie seleccionada SN8OGLIND-103 se cruzaron con IOTYU, una línea patentada de Syngenta Seeds obtenida a lo largo de generaciones de autopolinización a partir de la variedad japonesa tradicional de polinización abierta Makuwauri EIJYU (Nanto Seed Co., Ltd., Kashiwara, Nara, Japón). Se seleccionó la misma debido a su carácter no climatérico, no crítico, contenido muy alto de azúcares, contenido elevado de ácido cítrico, y piel amarilla.

15 2. Las plantas seleccionadas de la progenie procedente del cruzamiento anterior se cruzaron con SOLAZ-19, una línea patentada de Syngenta Seeds obtenida a través de 5 generaciones de autopolinización a partir de un híbrido comercial SOLAR KING F1 (Nunhems Zaden BV, Haelen, Holanda). Es un tipo de melón Galia de duración larga, no crítico, seleccionado para el propósito debido a ser no climatérico, tener un contenido muy alto de azúcares, pulpa blanca, y corteza amarilla y reticulada.

20 Se llevaron a cabo siete ciclos de autopolinización a partir de estas progenies cruzadas. La selección y fijación de las progenies de autopolinización se realizó con los datos analíticos para pH, contenidos de azúcares y ácidos orgánicos (Tablas 8C y 8D). Se seleccionaron las progenies de líneas fijas:

25 A) SOLAZ 1, seleccionado como pH bajo en combinación con acumulación alta de azúcares, tolerancia al mildiu pulverulento, y planta con adaptación a crecimiento en verano (Tablas 8E y F).

30 B) SOLAZ 2 se seleccionó como pH bajo con combinación para acumulación media de azúcares, y plantas con adaptación a crecimiento en primavera (Tablas 8E y F).

35 3. Se utilizaron las progenies SOLAZ 1 y SOLAZ 2 como polinizadores macho para cruzamientos con tres líneas patentadas de Syngenta Seeds, YUSOL 1, 2 y 3, obtenidas a través de 6 generaciones de autopolinización a partir de un híbrido de progenie MD.997F1 del cruce YUCA-15 x SOLAR 48, ambas líneas patentadas de Syngenta con el origen arriba indicado.

Se obtuvieron las combinaciones F1 siguientes:

40 A) YUSOL 1/SOLAZ 1; cuando se utiliza SOLAZ 1 como polinizador de líneas YUSOL 1.

B) YUSOL 2/SOLAZ 1; cuando se utiliza SOLAZ 1 como polinizador de líneas YUSOL 2.

C) YUSOL 3/SOLAZ 2; cuando se utiliza SOLAZ 2 como polinizador de líneas YUSOL 3.

45 El análisis de estas plantas seleccionadas y controles disponibles comercialmente se muestra en las Tablas 9 y 10. Las plantas se cultivaron en las condiciones descritas en el Ejemplo 6. Se muestra el número de frutos ensayados en cada experimento (Nº frt). Las medidas se realizaron como se describe en los Ejemplos 1-5. Las cifras para sacarosa (sac), hexosas (hex), y azúcares totales se expresan en g por 100 g de peso fresco (pf). Las cifras para ácido cítrico y ácido málico se expresan en mg por 100 g de peso fresco (pf).

55

60

65

Tabla 9A SOLAZ

Condiciones de desarrollo	Nº ft.	sac. media	sac. dev.est.	hex. media	hex. dev.est.	azúcar total media	azúcar total dev.est.	hex/sac actividad inv.	pH media	pH dev.est.	citrico media	citrico dev.est.	citrico/málico	málico media	málico dev.est.
<u>SOLAZ/2</u> SP03PS	8	2,41	1,70	3,41	0,34	5,82		1,42	4,6	0,2	605	98	42	14	21
FA03PS	37	1,43	0,81	5,12	0,36	6,55	1,34	3,58	4,7	0,2	576	86	52	11	15
<b>Media</b>	<b>43</b>	<b>1,92</b>		<b>4,27</b>		<b>6,19</b>		<b>2,50</b>	<b>4,6</b>		<b>590</b>		<b>47</b>	<b>13</b>	
<u>SOLAZ/1</u> SP03PS	4	2,90	0,86	3,93	0,42	6,83		1,35	4,6	0,0	549	81	16	33	15
FA03PS	35	1,85	1,18	5,88	0,33	7,73	1,60	3,17	4,5	0,1	663	107	35	19	17,5
<b>SOLAZ/1</b> SP03PS	<b>4</b>	<b>2,01</b>	<b>0,22</b>	<b>3,82</b>	<b>0,20</b>	<b>5,83</b>		<b>1,90</b>	<b>4,6</b>	<b>0,1</b>	<b>513</b>	<b>53</b>	<b>20</b>	<b>26</b>	<b>11</b>
FA03PS	16	1,80	0,74	5,32	0,27	7,13	1,25	2,95	4,5	0,1	591	83	52	11	10
<b>SOLAZ/1</b> SP03PS	<b>5</b>	<b>2,35</b>	<b>0,88</b>	<b>3,79</b>	<b>0,37</b>	<b>6,14</b>		<b>1,61</b>	<b>4,8</b>	<b>0,2</b>	<b>497</b>	<b>58</b>	<b>14</b>	<b>36</b>	<b>24</b>
FA03PS	7	2,02	1,36	6,14	0,36	8,15	1,65	3,04	4,5	0,1	664	86	28	24	24
<b>Media</b>	<b>71</b>	<b>2,16</b>		<b>4,81</b>		<b>6,97</b>		<b>2,34</b>	<b>4,6</b>		<b>579</b>		<b>27</b>	<b>25</b>	
<b>Media SOLAZ/1 y /2</b>	<b>114</b>	<b>2,10</b>		<b>4,68</b>		<b>6,77</b>			<b>4,6</b>		<b>582</b>		<b>27</b>	<b>22</b>	

Tabla 9B YUSOL

Condiciones de desarrollo	N° frt.	sac. media	sac. dev.est.	hex. media	hex. dev.est.	azúcar total media	azúcar total dev.est.	hex/sac actividad inv.	pH media	pH dev.est.	cítrico media	cítrico dev.est.	cítrico/málico	málico media	málico dev.est.
<u>YUSOL/1</u> SP03PS	8	4,25	1,18	4,77	0,82	9,02		1,12	6,0	0,3	295	85	47	6	10
FA03PS	8	5,01	0,58	5,33	0,85	10,34	1,16	1,07	6,3	0,1	214	49	13	16	10
<b>Media/1</b>	<b>16</b>	<b>4,63</b>		<b>5,05</b>		<b>9,68</b>		<b>1,09</b>	<b>6,1</b>		<b>255</b>		<b>30</b>	<b>11</b>	
<u>YUSOL/2</u> SP03PS	6	2,58	0,62	4,99	0,81	7,57		1,94	5,8	0,1	297	83	424	1	3
FA03PS	1	3,92		7,30		11,21		0,54	5,9		344		X	0	
<b>Media/2</b>	<b>7</b>	<b>3,25</b>		<b>6,14</b>		<b>9,39</b>		<b>1,24</b>	<b>5,9</b>		<b>320</b>			<b>1</b>	
<u>YUSOL/3</u> SP03PS	6	5,04	1,43	4,04	0,81	9,08	0,54	0,80	6,1	0,2	225	97	12	18	21
FA03PS	5	6,23	0,67	5,64	0,47	11,87		0,91	6,2	0,2	218	62	9	24	10
<b>Media/3</b>	<b>11</b>	<b>5,63</b>		<b>4,84</b>		<b>10,47</b>		<b>0,85</b>	<b>6,2</b>		<b>221</b>		<b>11</b>	<b>21</b>	
<b>Media 1,2 y 3</b>	<b>34</b>	<b>4,50</b>		<b>5,34</b>		<b>9,85</b>		<b>1,06</b>	<b>6,05</b>		<b>265</b>		<b>24</b>	<b>11</b>	

Tabla 10A: Híbrido SOLAZ X YUSOL

Condiciones de desarrollo	Nº frt.	sac. media	sac. dev.est.	hex. media	hex. dev.est.	azúcar total media	hex/sac actividad inv.	pH media	pH dev.est.	citríco media	citríco dev.est.	citríco/málico	málico media	málico dev.est.
<u>SOLAZ1X</u> SP03PV	4	5,58	1,07	3,38	0,51	8,95	0,61	4,8	0,1	845	87	11240	0	2
YUSOL/1 SP03OF1	5	6,25	0,43	3,71	0,70	9,96	0,59	4,7	0,1	794	25	76	10	12
SP03OF2	5	6,90	0,60	2,55	0,19	9,44	0,37	4,8	0,1	679	50	47	14	8
<b>Media/1</b>	<b>14</b>	<b>6,24</b>		<b>3,21</b>		<b>9,45</b>	<b>0,52</b>	<b>4,8</b>		<b>773</b>		<b>97</b>	<b>8</b>	
SOLAZ1X SP03PS	3	3,45	0,24	4,68	0,52	8,14	1,36	4,7	0,1	697	32	45	16	12
YUSOL/2 SP03OF1	5	9,20	0,34	2,85	0,19	12,05	0,31	4,7	0,1	800	27	42	19	7
SP03OF2	4	7,01	1,30	2,69	0,40	9,70	0,38	4,8	0,1	744	46	39	19	4
<b>Media/2</b>	<b>12</b>	<b>6,56</b>		<b>3,41</b>		<b>9,97</b>	<b>0,68</b>	<b>4,7</b>		<b>747</b>		<b>42</b>	<b>18</b>	
SOLAZ2X SP03PV	4	4,41	0,72	3,20	0,44	7,61	0,73	4,7	0,2	863	62	100	9	18
YUSOL/3 SP03OF1	4	4,94	2,05	3,23	0,29	8,17	0,65	4,5	0,1	789	85	277	3	4
SP03OF1	5	9,42	1,09	2,04	0,37	11,46	0,22	4,9	0,1	694	63	109	6	2
<b>Media/3</b>	<b>13</b>	<b>6,26</b>		<b>2,82</b>		<b>9,08</b>	<b>0,53</b>	<b>4,7</b>		<b>782</b>		<b>162</b>	<b>8</b>	
<b>Media</b>	<b>39</b>	<b>6,35</b>		<b>3,15</b>		<b>9,50</b>	<b>0,58</b>	<b>4,7</b>		<b>767</b>		<b>70</b>	<b>11</b>	

Tabla 10B: Controles

Condiciones de desarrollo	Nº frt.	sac. media	sac. dev.est.	hex. media	hex. dev.est.	azúcar total media	azúcar total dev.est.	hex/sac actividad inv.	pH media	pH dev.est.	citrico media	citrico dev.est.	citrico/málico	málico media	málico dev.est.
<u>SOLARF1</u> SP03PS	6	5,28	0,93	2,52	0,32	7,80	0,92	0,48	6,1	0,08	500	51	28	18	26
FA03PS	2	3,50	0,05	6,55	0,17	10,06	0,22	1,87	6,9	0,04	109	17	X	0	0
<b>Media</b>	<b>8</b>	<b>4,39</b>		<b>4,54</b>		<b>8,93</b>		<b>1,17</b>	<b>6,48</b>		<b>305</b>		<b>35</b>	<b>9</b>	
<u>MILENIUM</u>															
SP03PV	4	2,99	1,23	4,94	0,67	7,93	1,57	1,65	5,8	0,1	546	25	X	0	0
SP03OF1	5	2,29	0,15	4,16	0,10	6,44	0,15	1,82	5,8	0,05	441	23	X	0	0
SP03OF2	3	5,15	3,82	3,30	0,99	8,45	4,81	0,64	6,1	0,4	345	40	X	0	0
<b>Media</b>	<b>12</b>	<b>3,47</b>		<b>4,13</b>		<b>7,61</b>		<b>1,37</b>	<b>5,88</b>		<b>444</b>		<b>X</b>	<b>0</b>	

## ES 2 313 273 T3

### Ejemplo 9

#### *Introgresión del rasgo en YUSAZ A*

5 El rasgo de pH bajo se introgresó en melones LSL de pulpa verde no climatérico con forma redonda y piel suturada amarilla.

10 1. El retrocruzamiento directo se realizó a partir de la línea 755YUCIND-419 utilizando como parental recurrente la línea MG.755-68 arriba indicada.

Plantas seleccionadas de la progenie del cruzamiento previo se cruzaron con YUCA-64, una línea patentada de Syngenta Seeds obtenida a lo largo de 5 generaciones de autopolinización a partir de un mismo origen como la línea hermana arriba indicada.

15 Esta línea se seleccionó debido a su pulpa verde, no crítica, no climatérica de duración larga, contenido en azúcares muy alto, textura de sandía muy crujiente y sutura.

20 Se realizaron tres ciclos de autopolinización a partir de estas progenies cruzadas. La selección y fijación de las progenies de autopolinización se realizó con datos analíticos para pH, contenidos en azúcares y de ácidos orgánicos (Tablas 8C-E).

25 2. Las plantas seleccionadas de la progenie arriba generada se cruzaron con YUSOL 3, una línea patentada de Syngenta Seeds arriba descrita. Esta idea se seleccionó debido a su pulpa verde, ciclo más corto, muy alto contenido en azúcares, corteza amarilla y suturas.

30 Se realizaron cinco ciclos de autopolinización a partir de las progenies cruzadas previas. El proceso de selección y fijación de la progenie se concentró en las progenies de autopolinización para ciclo corto, pulpa verde, textura de sandía crujiente y corteza amarilla. La selección y fijación se vio asistida con datos analíticos para pH, contenidos en azúcares y en ácidos orgánicos. Se seleccionaron de este modo y se fijaron la progenie de las líneas YUSAZ A.

35 3. Se utilizaron líneas YUSAZ A como polinizadores machos para cruzamientos con tres líneas patentadas de Syngenta Seeds, YUSOL 1, una línea patentada de Syngenta Seeds arriba descrita. Se obtuvo la combinación F1: YUSOL 1/YUSAZ A.

40 El análisis de estas plantas seleccionadas se muestra en la Tabla 11. Las plantas se cultivaron en las condiciones descritas en el Ejemplo 6. Se muestra el número de frutos ensayados en cada experimento (N° frt). Las medidas se realizaron como se describe en los Ejemplos 1-5. Las cifras para sacarosa (sac), hexosa (hex) y azúcares totales se dan en g por 100 g de peso fesco (pf). Las cifras para ácido cítrico y ácido málico se dan en mg por 100 g de peso fresco (pf).

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

70

Tabla 11A: YUSAZA

Condiciones de desarrollo	N° ft.	sac. media	sac. dev.est.	hex. media	hex. dev.est.	azúcar total media	azúcar total dev.est.	hex/sac actividad inv.	pH media	pH dev.est.	cítrico media	cítrico dev.est.	cítrico/ málico	málico media	málico dev.est.
<u>YUSAZA/1</u>	16	3,01	1,28	5,36	0,67	8,37		1,78	4,6	0,2	602	90	28	22	13
SP03PS	3	2,05	0,43	5,62	0,37	7,67		2,74	4,6	0,1	655	135	21	31	1
FA02PS	6	3,70	1,00	5,76	0,53	9,46	1,92	1,55	4,6	0,2	514	115	23	23	18
SU03PS	43	2,10	0,73	7,01	0,44	9,11	1,25	3,34	4,6	0,2	568	82	44	13	18
FA03PS	68	2,72		5,94		8,65		2,35	4,6		582		29	22	
<b>Media</b>															
<u>YUSAZA/2</u>	25	3,81	0,99	5,03	0,54	8,84		1,32	4,8	0,2	586	55	17	35	14
SP03PS	6	3,53	0,83	5,74	0,38	9,27		1,63	4,6	0,1	582	70	10	56	15
FA02PS	95	3,99	1,42	4,82	0,41	8,80	1,72	1,21	4,8	0,3	543	80	16	33	19
SU03PS	52	3,70	1,30	6,12	0,36	9,81	1,28	1,66	4,7	0,1	578	63	18	33	13
FA03PS															
<b>Media</b>	178	3,76		5,43		9,18		1,46	4,7		572		15	39	
<b>media A/1, /2</b>	246	3,24		5,68		8,92		1,90	4,7		577		19	31	

Tabla 11B: Híbridos F1 utilizando YUSAZ A

Condiciones de desarrollo	N° frt.	sac. media	sac. dev.est.	hex. media	hex. dev.est.	azúcar total media	azúcar total dev.est.	hex/sac actividad inv.	pH media	pH dev.est.	cítrico media	cítrico/málico	málico media	málico dev.est.
Híbrido F1 SP03PS YUSAZA/1 YUSOL	12	5,24	1,83	5,09	0,99	10,33		0,97	4,9	0,2	659	69	10	7
Híbrido F1 SP03PS YUSAZA/2 YUSOL	5	3,68	0,46	5,40	0,63	9,08		1,47	4,6	0,1	724	35	21	8
<b>Media</b>	<b>17</b>	<b>4,46</b>		<b>5,24</b>		<b>9,70</b>		<b>1.22</b>	<b>4,8</b>		<b>692</b>	<b>46</b>	<b>15</b>	

Se indican las características de la línea YUSAZ A. YUSAZ A/1 y YUSAZ A/2 representan dos líneas hermanas. Los híbridos de F1 resultan de un cruzamiento con la línea YUSOL.

## ES 2 313 273 T3

### Ejemplo 10

#### *Introgresión del rasgo en YUSAZ B*

5 El rasgo de pH bajo se introgresó en pulpa verde de melones LSL no climatéricos con forma redonda y piel suturada amarilla.

10 1. Plantas seleccionadas del cruzamiento de la progenie SN8OGLIND-103 x IOTYU arriba indicada se sometieron a retrocruzamiento de nuevo con IOTYU, melones de pulpa verde no críticos y muy poco climatéricos (véase la Tabla 8D).

15 Plantas seleccionadas de la progenie del cruzamiento previo se cruzaron con YUCA-40, una línea patentada de Syngenta Seeds obtenida a lo largo de 5 generaciones de autopolinización a partir de un mismo origen como la línea hermana arriba indicada (véase la Tabla 8E).

Esta línea se seleccionó debido a su pulpa verde, duración larga no climatérica, y muy altos contenidos en azúcares con textura de sandía muy crujiente y suturas.

20 2. Plantas seleccionadas de la progenie generadas después de un ciclo de autopolinización a partir de la progenie anterior se cruzaron con YUSOL 3, una línea patentada de Syngenta Seeds arriba descrita. Esta línea se seleccionó debido a su pulpa verde, ciclo más corto, muy altos contenidos en azúcares, corteza amarilla y suturas (véase la Tabla 8F).

25 Se llevaron a cabo cinco ciclos de autopolinización a partir de las progenies de cruzamiento previas. Las progenies de autopolinización se seleccionaron en cuanto a pulpa verde, textura crujiente de sandía, contenido elevado de ácido cítrico y corteza amarilla.

30 3. La selección y fijación se vio asistida por los datos analíticos para pH, contenidos en azúcares y en ácidos orgánicos. Se seleccionó progenie de líneas fijas YUSAZ B (Tabla 12).

YUSAZ B es un ejemplo de una planta de melón “cítrico+”.

35 Se utilizaron líneas YUSAZ B como polinizadores masculinos para cruzamientos con tres líneas patentadas de Syngenta Seeds, YUSOL 1, una línea patentada de Syngenta Seeds arriba descrita. Se obtuvo la combinación F1: YUSOL 1/YUSAZ B (Tabla 12).

40 Las plantas se cultivaron en las condiciones descritas en el Ejemplo 6. Se muestra el número de frutos sometidos a ensayo en cada experimento (Nº. frt). Las medidas se llevaron a cabo como se describe en los Ejemplos 1-5. Las cifras para sacarosa (sac), hexosas (hex) y azúcares totales se expresan en g por 100 g de peso fresco (pf). La cifra para ácido cítrico y ácido málico se dan en mg por 100 g de peso fresco (pf).

45 (Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

Tabla 12: YUSAZ B

Condiciones de desarrollo	Nº ft.	sac. media	sac. dev.est.	hex. media	hex. dev.est.	azúcar total media	azúcar total dev.est.	hex/sac actividad inv.	pH media	pH dev.est.	cítrico media	cítrico dev.est.	cítrico/málico	málico media	málico dev.est.
<u>YUSAZB/O</u>															
SP03PS	7	3,16	0,66	4,99	0,60	8,14		1,58	4,7	0,1	891	73	17	73	12
FA02PS	2	2,46	0,01	5,75	0,42	8,20		2,34	4,3	0,0	848	14	11	75	2
FA03PS	6	1,61	0,61	6,63	0,39	8,24	1,02	4,12	4,4	0,1	878	169	11	78	57
<b>Media</b>	<b>15</b>	<b>2,41</b>		<b>5,79</b>		<b>8,19</b>		<b>2,68</b>	<b>4,5</b>		<b>872</b>		<b>13</b>	<b>75</b>	
<u>YUSAZ B/I</u>															
SP03PS	6	1,81	1,20	6,74	0,40	8,55		3,71	4,7	0,2	696	133	39	18	17
FA02PS	1	2,72		6,76		9,48		2,48	4,7		739		18	41	
FA03PS	8	1,21	0,45	8,39	0,20	9,60	0,69	6,94	4,7	0,1	939	37	26	36	16
<b>Media</b>	<b>15</b>	<b>1,91</b>		<b>7,30</b>		<b>9,21</b>		<b>4,38</b>	<b>4,7</b>		<b>791</b>		<b>28</b>	<b>32</b>	
<b>media YUSAZ B/O, /I</b>	<b>30</b>	<b>2,16</b>		<b>6,54</b>		<b>8,70</b>		<b>3,53</b>	<b>4,6</b>		<b>832</b>		<b>16</b>	<b>53</b>	

Se muestran las características de la línea YUSAZ B. YUSAZ B/I y YUSAZ B/O representan dos líneas hermanas. Los híbridos F1 resultan de un cruzamiento con la línea YUSOL.

## ES 2 313 273 T3

### Ejemplo 11

#### *Introgresión del rasgo en MEHARI F1*

5 El rasgo de pH bajo se introgresó en melones de pulpa naranja. La diana seleccionada fue la conversión del híbrido comercial MEHARI (Syngenta Seeds) en dos versiones de pH bajo, una con contenido mayor de ácido cítrico y otra con contenido menor de ácido cítrico.

10 1. Cruzamientos directos de las líneas 755 YUCIND-49 y 755 YUCIND-75 se realizaron utilizando como línea parental recurrente la L53, una línea patentada de Syngenta Seeds. L53 es un tipo de melón Charentais seleccionado para el propósito debido a altos contenidos en azúcares y bajos en cítrico. L53 es un parental de híbrido comercial MEHARI (véase la Tabla 8F).

15 Durante el proceso de retrocruzamiento y dentro de la progenie de cada una de las plantas cruzadas con pH bajo y percepción mayor o menor de ácido (contenido cítrico mayor o menor), se seleccionaron además de otros rasgos que eran más próximos al L53 recurrente. Después del segundo retrocruzamiento (tercer cruzamiento) se obtuvieron las progenies siguientes:

20 a) L53(3)x755YUCIND75-15/03/06/, seleccionada para pH bajo y contenido bajo en ácido cítrico

b) L53(3+)x755YUCIND49-8/2/03/05/, seleccionada para pH bajo y contenido elevado en ácido cítrico.

25 Se realizaron cuatro ciclos de autopolinización a partir de estas progenies cruzadas y un retrocruzamiento ulterior con L53. El proceso de selección y fijación de la progenie en las progenies de autopolinización se ayudó con datos analíticos para pH, azúcares y contenidos de ácidos orgánicos.

2. Se seleccionaron las progenies de líneas fijas:

30 A) L53AZ A fue seleccionada de la población previa a) y fijada para contenido bajo de ácido cítrico y pH bajo y, para otros rasgos, próxima a la L53 recurrente.

La línea L53AZ A es un ejemplo de una planta de melón “cítrico”.

35 B) L53AZ B se seleccionó de la población previa b) y se aisló para pH bajo y contenido alto de ácido cítrico y, para otros rasgos, próxima a la L53 recurrente.

40 Se ensayaron también plantas para el color de pulpa naranja intenso en presencia del rasgo de pH bajo. La intensidad del color naranja en la pulpa tuvo que seleccionarse particularmente, dado que generalmente una intensidad de color naranja pobre tendía a asociarse con el pH bajo ácido en la pulpa del fruto (véase la Tabla 4).

Se utilizaron las líneas de progenie L53AZA y L53AZB, y la línea L53 en cruzamientos con la otra línea parental de MEHARI para obtener MEHARI AZA, MEHARI AZB y MEHARI, la F1 comercial actual, respectivamente.

45 Todos estos productos, líneas y cruzamientos se sometieron a ensayo en pruebas agronómicas y se recogieron los datos analíticos de los frutos (Tabla 13).

50 Las plantas se cultivaron en las condiciones descritas en el Ejemplo 6. Se muestra el número de frutos sometidos a ensayo en cada experimento (Nº. frt). Las medidas se llevaron a cabo como se describe en los Ejemplos 1-5. Las figuras para sacarosa (sac), hexosas (hex) y azúcares totales se dan en g por 100 g de peso fresco (pf). Las cifras para ácido cítrico y ácido málico se dan en mg por 100 g de peso fresco (pf).

55

60

65

Tabla 13A: MEHARI, pH bajo/pH alto

Condiciones de desarrollo	Nº frt.	sac. media	sac. dev.est.	hex. media	hex. dev.est.	azúcar total media	azúcar total dev.est.	hex/sac actividad inv.	pH media	pH dev.est.	cítrico media	cítrico dev.est.	cítrico/málico	málico media	málico dev.est.
Macho pH alto	4	4,11	1,66	2,93	0,67	7,04		0,71	6,9	0,2	65	26	1	114	38
cit/- (L53)	3	1,98	0,85	2,70	2,05	4,68		1,36	6,2	0	52	11	1	55	26
FA03PS	6	9,07	0,67	4,07	0,40	13,14	1,06	0,45	6,9	0,2	159	40	1	109	18
<b>Medial/ pH alto-</b>	<b>10</b>	<b>5,05</b>		<b>3,23</b>		<b>8,29</b>			<b>6,7</b>		<b>92</b>		<b>1</b>	<b>93</b>	
Macho ácido cit/-	4	2,75	1,65	3,85	0,38	6,61		1,40	5,0	0,3	442	169	4	109	51
(L53AZA SU03PS)	24	2,03	1,40	3,36	1,11	5,82	1,83	1,65	4,8	0,3	484	132	3	150	64
(L53)	48	2,76	1,85	6,07	0,62	8,82	2,19	2,20	4,8	0,4	600	158	3	200	130
<b>Medial/ pH bajo cítrico-</b>	<b>76</b>	<b>2,51</b>		<b>4,42</b>		<b>7,09</b>			<b>4,9</b>		<b>509</b>		<b>3</b>	<b>153</b>	
Macho ácido (L53AZ B SU03PS)	3	4,82	1,37	2,72	0,30	7,54		0,56	5,0	0,1	654	86	9	75	23
FA03PS	12	3,74	1,50	3,33	0,89	7,08	1,64	0,89	4,7	0,1	670	95	10	64	26
FA03PS	37	4,14	1,64	5,57	0,70	9,71	1,76	1,35	4,7	0,2	779	74	12	63	20
<b>Medial/ pH bajo cítrico+</b>	<b>52</b>	<b>4,24</b>		<b>3,87</b>		<b>8,11</b>			<b>4,8</b>		<b>701</b>		<b>11</b>	<b>67</b>	

Tabla 13B: Híbridos de MEHARI, pH bajo/pH alto

Condiciones de desarrollo	Nº frt.	sac. media	sac. dev.est.	hex. media	hex. dev.est.	azúcar total media	azúcar total dev.est.	hex/sac actividad inv.	pH media	pH dev.est.	cítrico media	cítrico dev.est.	cítrico/málico	málico media	málico dev.est.
Híbrido F1 SP03PS	7	5,06	1,26	3,15	0,69	8,21		0,62	6,6	0,2	233	70	3	73	10
MEHARI FA03PS	7	2,86	0,80	6,53	1,42	9,40	1,70	2,28	6,0	0,2	316	137	9	34	23
pH alto	14	3,96		4,84		8,80		1,22	6,3		274		5	54	
Híbrido F1 SP03PS	7	3,10	1,42	4,46	0,53	7,55		1,44	5,4	0,2	447	85	6	79	22
pH bajo FA03PS	6	1,39	1,46	5,75	0,66	7,14	1,99	4,14	4,6	0,2	527	80	7	76	27
cítrico -	13	2,24		5,10		7,34		2,27	5,0		487		6	78	
Híbrido F1 SP03PS	7	3,19	1,22	4,56	0,67	7,76		1,43	4,8	0,1	619	78	12	53	23
pH bajo SP03OF1	3	5,82	1,55	3,63	0,76	9,45	0,86	0,62	4,9	0,2	718	57	20	37	7
cítrico +	7	1,12	0,52	6,73	0,56	7,84	0,88	6,02	4,5	0,1	654	128	7	92	69
Media	17	3,37		4,97		8,35		1,47	4,76		663		11	60	

## ES 2 313 273 T3

### Ejemplo 12

#### *Análisis sensorial*

- 5 El análisis sensorial de los frutos de las plantas de la presente invención fue realizado por un panel de Expertos. El panel estaba compuesto de 12 personas, entrenadas específicamente para describir la textura de los melones, y los sabores de azúcares y ácidos. Se realizaron seis sesiones de entrenamiento antes de las sesiones expertas. El programa de entrenamiento de estudios fue:
- 10 - Entrenamiento 1: Lectura del léxico de sabor. La notación de 6 productos en la sala de ensamblaje y discusión a fin de ver qué descriptor es difícil de conducir a acuerdo.
- Entrenamiento 2: Notación de 2 productos + 2 repetidos en el laboratorio de análisis sensorial para observar de qué modo el panel evalúa personalmente los descriptores.
- 15 - Entrenamiento 3: Se presentan al panel los resultados del entrenamiento 2. La notación de 2 productos + 2 repetidos en la sala de ensamblaje, y discusión. La notación de 2 productos en las cabinas individuales.
- 20 - Entrenamiento 4: Trabajos sobre soluciones de azúcares y ácidos a concentraciones diferentes para evaluar las dificultades del panel en cuanto a estos descriptores. Los resultados del entrenamiento 3 se presentan al panel. La notación de 3 productos + 1 repetido en la sala de ensamblaje y, discusión. La notación de 3 productos + 1 repetido en cabinas individuales.
- 25 - Entrenamiento 5: Notación de 4 productos en la sala de ensamblaje y notación de 2 productos + 2 repetidos en las cabinas individuales. La misma permite comprobar la repetibilidad de los degustadores de la sesión. Se trabaja sobre soluciones ácidas.
- Entrenamiento 6: Notación de 3 productos en la sala de ensamblaje y notación de 2 productos + 2 repetidos en las cabinas individuales para comprobar la repetibilidad de los degustadores dentro de la sesión.
- 30

35 El análisis sensorial se llevó a cabo en un laboratorio de análisis sensorial con aire acondicionado equipado con cabinas individuales. Se utilizó una escala estructurada de valoración en 10 puntos (de 0 a 9), con los descriptores siguientes:

#### *Sabor dulce*

40 Definición: Es aproximadamente la percepción del sabor dulce percibida en la boca.

Modo de evaluación: Masticar el producto hasta su desaparición. Estimar la intensidad del sabor dulce. Notación: 0 = no dulce, 9 = muy dulce.

#### 45 *Sabor ácido*

Definición: Es aproximadamente la percepción del sabor ácido percibido en la boca.

50 Modo de evaluación: Masticar el producto hasta su desaparición. Estimar la intensidad del sabor ácido. Notación: 0 = no ácido, 9 = muy ácido

#### Protocolo de preparación

- 55 - Lavado de los melones en agua fría
- Corte longitudinal del melón
- Eliminación de la pulpa y las semillas.
- 60 - Corte de cada mitad de los melones en 3 partes (corte longitudinal)
- Eliminación de los extremos de 3 partes
- 65 - Corte de cada parte en 2 a fin de obtener 6 partes sobre la mitad del melón.

## ES 2 313 273 T3

### Presentación de los productos

- Las muestras se presentan codificadas con números aleatorios y de acuerdo con un plan de presentación (cuadrados latinos) evitando los efectos del orden de presentación.
- Los productos se dan uno tras otro.

5

10 Las Tablas 14 y 15 muestran los resultados de dos análisis sensoriales realizados sobre frutos diferentes. En la Tabla 14, las plantas se sembraron a primeros de marzo y se trasplantaron a campos protegidos abiertos como cosechas de vid a primeros de abril. Los frutos se recolectaron a principios de julio. En la Tabla 14A, los frutos se almacenaron durante 7 a 12 días a 10°C, seguidos de 2 días a 20°C. En la Tabla 14B, los frutos se almacenaron durante 4 a 8 días a 10°C, seguidos de 2 días a 20°C.

15 En la Tabla 15, las plantas se sembraron a principios de agosto y se trasplantaron a invernaderos como cosechas apiladas a finales de agosto. Los frutos se recolectaron a primeros de noviembre. Los frutos se almacenaron durante 4 a 8 días a 5°C, seguidos de 3 días a 20°C.

20 El análisis sensorial se llevó a cabo sobre el número de frutos indicado en las Tablas. Cada fruto se sometió a test por los 12 degustadores cualificados. Las cifras para sabores ácido y de azúcar para cada línea representan el valor medio del número de frutos multiplicado por 12 (para los 12 degustadores). Las Tablas 14 y 15 muestran también medidas del pH y de los contenidos de azúcares y ácido orgánico para los productos sometidos a ensayo.

25

(Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 14A

	FRT nr	Brix	pH	Glu g/100 g	Suc g/100 g	Fru g/100g	Azúcar tot. g/100 g	Ac. cítrico mg/100 g	Ac. Málico mg/100 g	Sabor ácido	Sabor azúcar
YUSOL1 X SOLAZ1/ básico	10	11.7	6.24	1.2	7.2	2.1	10.6	309	4	0.5	5.6
		2.1	0.30	0.3	2.3	0.3	1.9	121	10	0.3	1.0
YUSAZ A X YUSOL	6	12.7	4.79	1.1	7.7	2.0	10.7	809	0	2.1	5.4
		0.5	0.09	0.2	0.6	0.2	0.5	17	0	0.7	0.5
SOLAZ2 X YUSOL3	10	13.5	4.68	1.5	7.9	2.0	11.3	832	18	3.6	4.7
		1.4	0.17	0.5	1.0	0.3	1.0	37	20	0.5	0.3
SOLAZ1 X YUSOL3	10	13.2	4.58	1.8	7.2	2.4	11.4	816	41	3.1	4.7
		0.8	0.22	0.6	1.2	0.4	0.6	37	32	1.2	0.6
Media SOLAZ X YUSOL	20	13.4	4.63	1.7	7.6	2.2	11.4	824	30	3.4	4.7

Tabla 14B

	FRT	Brix	pH	Glu g/100 g	Suc g/100 g	Fru g/100 g	Azúcar tot. g/100 g	Ac. cítrico mg/100 g	Ac. Málico mg/100 g	Sabor ácido	Sabor azúcar
Mehari hembra XL53	6	13.2	6.64	1.0	8.5	1.7	11.2	272	63	0.5	5.8
		1.7	0.09	0.1	1.5	0.2	1.5	54	32	0.2	0.6
Mehari hembra XL53AZA/1	7	13.4	5.20	1.1	7.8	1.9	10.8	652	88	1.7	5.2
		0.7	0.11	0.2	0.8	0.3	0.9	87	69	0.4	0.4
Mehari hembra XL53AZA/2	5	13.1	5.28	1.2	8.1	2.0	11.3	581	107	1.6	5.3
		0.8	0.08	0.2	0.9	0.1	0.8	50	40	0.4	0.6
Media hembra XL53AZA	12	13.3	5.24	1.2	8.0	2.0	11.1	617	98	1.7	5.3
Mehari hembra XL53AZ B	6	12.2	4.98	1.2	7.1	1.9	10.2	708	107	3.2	4.6
		1.0	0.21	0.1	0.7	0.2	0.9	78	44	0.6	0.3

Tabla 15

	FRT	Brix	pH	Glu g/100 g	Suc g/100 g	Fru g/100g	Azúcar tot. g/100 g	Ac. cítrico mg/100 g	Ac. Málico mg/100 g	Sabor ácido	Sabor azúcar
SOLAZ/2	Media	9.60	4.53	1.97	2.98	2.47	7.41	717	0	3.78	4.31
XYUSOL/3	dev. est.	0.53	0.06	0.36	0.30	0.36	0.94	39	0	0.84	0.55
SOLAZ/1	Media	11.00	4.74	2.14	4.04	3.05	9.24	574	0	2.54	5.63
XYUSOL/1	dev.est.	0.85	0.09	0.35	0.00	0.09	0.44	169	0	1.20	0.06
SOLAZ	Media	10.2	4.6	2.0	3.4	2.7	8.1	660	0	3.3	4.8
XYUSOL											
YUSOL X	Media	12.40	4.71	3.04	4.02	3.59	10.65	713	18	2.95	5.47
YLTSAZA	dev. est	1.04	0.17	0.56	1.04	0.67	0.68	42	15	0.40	0.75

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

	FRT	Brix	pH	Glu g/100 g	Suc g/100 g	Fru g/100g	Azúcar tot. g/100 g	Ac. cítrico mg/100 g	Ac. Málico mg/100 g	Sabor ácido	Sabor azúcar
TDX	8	12.13	4.97	1.23	5.53	2.06	8.82	696	74	2.56	5.72
L53		1.13	0.14	0.36	1.13	0.32	0.80	83	41	0.85	0.39
AZIA											
Mehari	3	9.50	5.10	1.48	3.48	2.52	7.48	632	62	2.17	5.50
hembra		1.32	0.27	0.17	0.70	0.37	1.17	79	25	0.43	0.55
XL53											
AZIA											

## ES 2 313 273 T3

### Ejemplo 13

#### *Análisis de marcadores moleculares*

5 Se extrajo DNA de hojas jóvenes (plantas de semillero de 15 días). Las hojas se liofilizaron y se extrajo el DNA siguiendo el método de Dellaporta (Dellaporta 1983).

10 Las condiciones de los ciclos de PCR fueron: 15 s de desnaturalización a 94°C, seguidos de 15 s de reasociación a 54°C y 30 s de extensión a 72°C durante 40 ciclos. El DNA de la muestra se desnaturalizó inicialmente durante 2 minutos a 94°C y se extendió durante 2 min a 72°C después de PCR.

15 La mezcla de PCR contenía MgCl<sub>2</sub> 1,65 mM, 60 mM de cada desoxirribonucleótido, tampón Taq 1X, 0,2 unidades de polimerasa Taq, 15-20 ng de DNA molde y 400 nM de cada iniciador no fluorescente ó 200 nM de cada iniciador marcado por fluorescencia. Los iniciadores fluorescentes se marcaron con 6-FAM, NED o HEX. Los productos PCR fluorescentes se separaron en un secuenciador capilar ABI3700 y sus tamaños se midieron utilizando el software de análisis de fragmentos de Applied Biosystems's Genescan and Genotyper.

20 Los productos PCR no fluorescentes se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 3% (Resophor, Eurobio) a 400V con un sistema de refrigeración. Los geles de tñeron con bromuro de etidio. Se utilizaron tres marcadores, CMAT141 (descrito en Danin-Poleg *et al.* (2001) Theor. Appl. Genet. 102: 61-72 y Danin-Poleg *et al.* (2002) Euphytica 125: 373-384) y NE0585 y NE1746. Los iniciadores para estos marcadores se muestran a continuación.

	Iniciador directo (5'-3')	Iniciador inverso (5'-3')
25 CMAT141	AAGCACACCAACCACCCGTAA (SEQ ID NO:1)	GTGAATGGTATGTTATCCTTG (SEQ ID NO:2)
30 NE0585	GTATCATGTCGGAGAAACG (SEQ ID NO:3)	CCTTTATCCCCACTTTTC (SEQ ID NO:4)
35 NE1746	TTCTCCGATGTGTCCTCTC (SEQ ID NO:5)	GTCGCTTGGAATATATCGG (SEQ ID NO:6)

40

### Ejemplo 14

#### *Análisis de los accesos*

45 Se analizó un cierto número de accesos de melones que comprendían un rasgo de pH bajo utilizando los marcadores anteriores. Los tamaños de los fragmentos amplificados se consignan a continuación en la Tabla 16. Los tamaños indicados (en pb) no son absolutos sino relativos a los productos de otros tamaños detectados con el mismo par de iniciadores. El tamaño real (exacto) de los fragmentos amplificados (determinados v.g. por secuenciación) podría ser  
50 ligeramente diferente (+/- 1 pb) de los indicados en esta memoria.

55

60

65

TABLA 16

	CMAT141	NEO585	NEI746
IND35-1.2.	173	230	127
IND35-2.3.	168	232	124
FAGOUS2:4-	176	228	253
FAGOUS2:5-	176		121
FAGOUS2:7-	176		253
PI414723	175	228	124
PI414724	175		124
PII61375	175	228	124
PII24112	175	239	124

30 Ejemplo 15

*Evolución de las características del fruto de frutos conservados en la planta*

35 Se cultivaron plantas como en el caso de las plantas de la Tabla 15 anterior. Se cosecharon los frutos en momentos de maduración diferentes (ciclo) calculados por la diferencia entre la fecha de recolección (HDT) y la fecha de polinización (PDT). Se consideró que se alcanzaba la madurez en un momento particular del ciclo, cuando el valor medio del contenido de sacarosa para los frutos en el momento particular del ciclo alcanzaban 2,0 g de sacarosa por 100 g de  
40 pf y utilizando otros signos de maduración tales como la senescencia de la hoja lateral. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Los resultados están basados en medidas individuales de los frutos y debe entenderse que algunos frutos pueden dar valores que se desvíen debido a deterioros, desarrollo aberrante u otros factores ambientales.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 17

FRT	nr	PDT	HDT	Ciclo	Color pulpa naranja 1 a 5	pH	Brix	GLU	SUC	FRU	HEX	Azúcar tot.	Ac cítrico	Ac málico
								g/100 g	g/100 g	mg/100 g				
	1	17	37	20	1	5.09	5.0	1.6	0.0	1.4	2.6	3.0	169	460
	1	16	37	21	1	4.83	5.4	1.8	0.0	1.7	3.9	3.5	167	273
	1	14	37	23	1	4.94	4.6	1.4	0.0	1.4	2.7	2.8	128	243
	1	16	40	24	1	4.55	4.8	1.4	0.0	1.2	2.8	2.6	387	314
TD X	1	16	40	24	1	4.66	5.0	1.2	0.0	1.7	2.9	2.9	387	114
L53 Az	1	14	40	26	2	4.88	6.5	1.9	0.0	1.4	2.3	3.3	498	255
A/1	1	14	40	26	2	4.44	7.0	1.4	0.6	2.7	4.1	4.7	852	119
Madurez	1	14	44	30	2	4.36	6.7	2.3	0.4	2.0	3.2	4.6	776	178
alcan-	1	14	44	30	2	4.47	7.0	1.7	0.5	2.2	3.9	4.3	528	77
zada	1	14	44	30	2	4.70	7.0	2.3	0.2	2.4	4.7	5.0	649	11
aproxi-	1	14	47	33	2	4.37	6.5	2.0	0.0	1.6	3.2	3.6	730	174
mada-	1	14	47	33	2	4.59	7.0	1.2	1.0	1.7	2.9	3.9	453	117
mente	1	14	47	33	3	4.85	13.6	2.3	3.9	1.9	4.0	8.2	876	199
en el ciclo 40														

continúa

nr	FRT	PDT	HDT	Ciclo	Color pulpa naranja	1 a 5	pH	Brix	GLU g/100 g	SUC g/100 g	FRU g/100 g	HEX g/100 g	Azúcar tot. g/100	Ac cítrico mg/100 g	Ac málico mg/100 g
1	17	37	20	1	4.45	4.8	1.7	0.1	1.8	3.5	3.5	307	319		
1	17	37	20	1	4.53	5.2	1.9	0.0	2.0	5.0	3.9	331	332		
1	14	37	23	1	4.43	4.1	1.0	0.0	1.1	2.3	2.1	572	323		
1	17	40	23	3	4.55	7.0	1.3	0.8	1.7	3.0	3.8	682	120		
1	14	40	26	2	4.48	6.0	1.3	0.3	1.8	3.2	3.5	590	136		
1	14	40	26	3	4.44	6.2	1.9	0.0	1.9	1.5	3.8	594	206		
1	17	44	27	2	4.36	4.9	1.5	0.0	1.3	2.8	2.9	640	295		
1	19	47	28	3	4.33	8.9	2.8	0.0	2.7	4.4	5.5	977	156		
1	14	44	30	2	4.65	6.0	1.0	1.3	2.4	3.4	4.8	715	56		
1	17	51	34	3	4.43	10.1	2.9	1.0	2.9	5.9	6.8	989	141		
1	17	51	34	3	4.77	11.0	1.9	3.5	2.5	4.4	7.9	836	31		
1	17	51	34	3	4.91	10.5	1.3	5.3	1.9	3.2	8.5	753	96		
1	16	51	35	3	4.31	8.6	2.2	0.9	2.1	5.0	5.3	970	216		
1	16	54	38	3	4.76	14.1	2.3	5.5	2.2	3.8	10.1	983	164		
1	14	54	40	4	4.80	14.8	2.1	7.0	2.1	4.0	11.3	992	166		
1	14	54	40	4	5.03	15.0	0.8	9.0	1.8	2.6	11.6	843	5		
1	17	58	41	3	4.99	14.5	1.6	8.0	2.1	3.6	11.6	909	75		
1	14	57	43	4	4.97	12.0	0.8	5.8	1.7	2.5	8.2	635	76		
1	14	57	43	5	5.20	14.0	1.2	6.3	1.7	2.9	9.2	711	64		
1	14	58	44	4	5.06	16.0	1.6	8.5	1.7	3.4	11.9	986	50		

TD X  
L53 Az A/1  
Madurez  
alcanzada  
apro-  
ximadamente  
en el ciclo 40

continúa

FRT	nr	PDT	HDT	Ciclo	Color pulpa naranja 1 a 5	pH	Brix	GLU g/100 g	SUC g/100 g	FRU g/100 g	HEX g/100 g	Azúcar tot. g/100	Ac cítrico mg/100 g	Ac málico mg/100 g
	1	21	40	20	1	4.45	4.7	1.5	0.0	1.3	1.3	437	292	
	1	17	37	20	1	4.62	4.5	1.1	0.1	1.4	2.5	295	98	
	1	17	40	23	1	4.78	5.0	1.0	0.2	1.9	2.9	482	71	
	1	14	40	26	2	4.54	5.0	1.1	0.1	1.6	2.7	397	81	
	1	17	44	27	2	4.46	5.0	1.2	0.4	1.9	3.1	547	38	
	1	17	44	27	2	4.43	4.9	1.6	0.0	1.4	1.4	561	187	
	1	17	44	27	2	4.52	6.0	1.5	0.7	1.9	3.4	505	18	
	1	19	51	32	4	4.81	8.0	1.3	2.7	2.2	3.5	575	76	
	1	19	51	32	2	4.50	6.2	2.0	0.0	1.6	2.8	592	75	
TD X	1	19	51	32	3	4.76	7.0	1.5	1.4	2.0	3.5	485	105	
L53 Az A/1	1	14	50	36	3	5.99	8.6	1.5	2.5	1.6	2.6	414	259	
Madurez	1	16	53	37	5	6.28	9.0	1.4	3.0	1.8	3.3	297	166	
alcanzada	1	17	54	37	4	5.57	8.5	1.7	2.6	2.6	4.3	309	261	
apro-	1	17	54	37	2	5.68	8.4	1.6	1.7	1.4	2.6	48	276	
ximadamente	1	14	51	37	3	4.86	5.8	1.3	0.4	1.4	3.9	339	339	
en el ciclo 40	1	14	51	37	4	6.36	9.0	1.5	2.7	1.9	3.4	276	167	
	1	17	54	37	4	5.21	12.0	1.6	4.5	1.9	3.5	532	56	
	1	16	54	38	5	5.79	9.5	1.4	3.8	2.7	4.1	351	264	
	1	17	57	40	2	5.47	9.0	1.7	1.5	1.4	4.0	410	312	
	1	17	57	40	4	4.63	10.9	2.4	3.0	2.3	3.8	894	111	
	1	17	57	40	5	6.22	9.5	1.5	3.8	2.1	3.6	360	277	

continúa

FRT	nr	PDT	HDT	Ciclo	Color pulpa naranja 1 a 5	pH	Brix	GLU g/100 g	SUC g/100 g	FRU g/100 g	HEX g/100 g	Azúcar tot.		Ac málico mg/100 g
												g/100	mg/100 g	
	1	17	37	20	1	4.84	4.5	0.7	0.3	1.7	2.5	2.7	368	33
	1	17	37	20	1	5.25	4.7	1.6	0.0	1.5	2.5	3.1	210	375
	1	17	37	20	1	5.31	4.3	1.4	0.0	1.2	2.6	2.6	200	288
	1	17	44	27	2	4.52	4.9	1.7	0.0	1.4	2.4	3.1	320	190
	1	17	44	27	2	4.49	5.0	0.8	0.3	1.7	2.5	2.8	423	5
	1	17	44	27	2	6.69	5.3	1.5	0.0	0.8	3.4	2.4	238	160
	1	17	44	27	2	4.47	6.0	2.1	0.0	1.7	7.5	3.8	437	183
	1	21	51	30	3	4.63	9.5	2.6	1.4	2.4	4.3	6.4	548	150
	1	17	47	30	2	4.53	7.4	2.4	0.1	2.1	4.0	4.6	672	126
	1	17	47	30	3	4.60	6.5	1.5	1.0	2.3	3.8	4.8	562	44
	1	17	51	34	2	4.68	6.5	2.0	0.2	1.9	2.6	4.1	713	99
	1	17	51	34	3	4.50	9.9	2.7	1.5	2.5	4.9	6.7	944	118
	1	16	51	35	4	5.35	10.5	1.7	4.0	2.9	4.6	8.6	723	32
	1	16	51	35	4	4.77	11.7	2.2	3.2	2.2	3.7	7.6	904	133
	1	14	50	36	2	5.84	7.1	1.4	0.6	1.5	2.6	3.5	224	168
	1	14	50	36	4	6.09	7.0	1.1	2.1	2.1	3.2	5.3	273	201
	1	14	50	36	2	5.95	8.3	1.6	1.7	1.8	3.7	5.1	279	235
	1	14	50	36	5	6.51	9.5	1.7	2.9	2.7	4.4	7.3	336	202
	1	14	51	37	4	5.13	10.0	1.5	3.8	2.4	3.9	7.7	599	77
	1	19	57	38	3	5.60	13.1	2.3	4.1	2.2	3.3	8.6	613	150
	1	19	57	38	3	4.62	12.2	3.0	3.7	2.7	5.2	9.4	1011	63

TD X

L53 Az A/1

Madurez

alcanzada

apro-

ximadamente

en el ciclo 40

continúa

FRT	PDT	HDT	Ciclo	Color pulpa naranja 1 a 5	pH	Brix	GLU g/100 g	SUC g/100 g	FRU g/100 g	HEX g/100 g	Azúcar tot. g/100 g	Ac cítrico mg/100 g	Ac málico mg/100 g
x2	9	37	28	4,23	5,0	1,6	0,1	1,7	4,0	3,3	664	116	
x2	9	37	28	4,30	5,1	1,8	0,0	1,9	4,8	3,7	496	123	
x2	9	37	28	4,21	5,9	2,4	0,0	2,0	3,7	4,4	674	77	
1	9	37	28	4,53	6,0	2,3	1,0	2,6	4,8	5,9	675	102	
x2	9	37	28	4,19	5,3	1,6	0,1	1,8	3,9	3,5	703	123	
x2	9	37	28	4,37	4,6	1,4	0,0	1,4	2,9	2,8	509	264	
x2	10	40	30	4,18	5,5	2,0	0,0	1,9	3,2	3,9	545	94	
x2	9	40	31	4,21	6,4	2,1	0,0	2,1	3,5	4,1	795	71	
1x	9	40	31	4,25	7,2	2,9	0,0	2,9	4,8	5,8	723	186	
1	9	40	31	4,37	6,8	2,3	0,3	2,8	5,1	5,4	667	55	
x2	9	40	31	4,15	5,5	1,9	0,0	2,0	4,7	3,9	728	146	
1x	9	44	35	4,21	8,6	2,8	0,0	3,3	6,4	6,2	990	34	
x2	9	44	35	4,70	7,0	2,1	1,7	3,0	5,0	6,7	706	0	
x2	9	44	35	4,18	7,3	2,3	0,0	2,8	5,3	5,1	984	32	
x2	9	44	35	4,17	7,3	2,1	0,0	2,7	5,8	4,8	992	28	
x2	9	44	35	4,06	6,5	2,3	0,0	2,3	4,9	4,6	990	67	
1	9	44	35	4,34	7,2	1,9	0,5	2,3	4,2	4,7	736	14	
1	9	47	38	4,49	10,2	2,4	3,3	2,8	5,2	8,5	761	0	
x2	9	47	38	4,24	9,0	2,6	0,6	3,1	6,7	6,2	782	15	
x2	9	47	38	4,21	10,5	3,1	0,9	3,4	7,3	7,5	834	41	
1	9	47	38	4,60	9,2	1,7	2,7	2,5	4,2	6,9	695	0	
x2	9	47	38	4,21	10,3	2,9	1,2	3,0	6,2	7,1	1052	53	
x2	9	50	41	4,44	9,2	2,2	2,0	2,4	4,7	6,6	701	24	
x2	9	50	41	4,69	10,5						803	66	
x2	9	50	41	4,76	10,2						853	37	
x2	9	50	41	4,77	10,4	1,8	3,6	2,8	4,6	8,2	637	1	
x2	9	50	41	4,56	12,2						943	0	
1	9	50	41	4,51	9,4	1,8	2,9	2,1	3,9	6,9	694	0	
x2	9	51	42	4,55	10,5						887	0	
x2	9	54	45	4,28	12,4	2,7	3,3	2,6	5,0	8,7	982	48	
x2	9	54	45	4,23	10,8	2,4	3,0	2,6	4,7	8,0	1026	61	
1	9	54	45	4,44	12,9	2,7	4,7	2,4	3,6	9,8	997	52	

TD X  
L53 Az A/1  
Madurez  
alcanzada  
apro-  
ximadamente  
en el ciclo 40

continúa

FRT	nr	PDT	HDT	Ciclo	Color pulpa naranja 1 a 5	pH	Brix	GLU g/100 g	SUC g/100 g	FRU g/100 g	HEX g/100 g	Azúcar tot. g/100	Ac cítrico mg/100 g	Ac málico mg/100 g
	x2	10	37	27	4.36	4.8	1.7	0.0	1.7	3.7	3.3	526	136	
	1	10	37	27	4.84	4.0	1.4	0.4	2.1	3.5	3.9	428	27	
	1	9	37	28	4.51	4.5	2.1	0.0	2.1	4.2	4.2	476	86	
	1	9	37	28	4.49	5.4	2.1	1.1	2.4	4.5	5.6	524	55	
	1	9	40	31	4.42	6.2	1.8	0.4	2.8	4.6	5.1	598	62	
	1	9	40	31	4.38	5.0	1.6	0.1	2.0	3.6	3.7	546	94	
	1	9	40	31	4.25	5.8	1.9	0.0	2.1	3.6	3.9	642	91	
	1	9	44	35	4.53	7.0	2.2	1.6	3.2	5.4	7.0	654	0	
	1	9	44	35	4.24	8.7	2.7	0.5	3.0	5.3	6.1	977	70	
	1	9	44	35	4.44	7.6	2.0	0.8	2.6	4.6	5.4	498	0	
	1	9	44	35	4.38	8.6	2.3	1.4	3.1	5.5	6.9	640	6	
	1	9	47	38	4.42	10.4	1.8	2.4	2.6	4.4	6.9	733	0	
	1	9	47	38	4.53	8.0	2.0	1.8	3.0	4.9	6.7	540	0	
	1	9	47	38	4.74	8.5	2.2	1.6	2.7	5.4	6.5	600	3	
	1	9	47	38	4.50	10.1	2.3	1.8	2.5	3.4	6.7	568	15	
	1	9	50	41	4.45	10.2	1.7	2.6	2.2	4.0	6.6	676	8	
	1	9	50	41	4.80	10.4	1.9	4.0	3.0	4.9	8.9	455	0	
	1	9	50	41	4.67	11.6	2.4	4.0	3.1	5.5	9.5	694	0	
	x2	9	51	42	4.42	11.1						796	28	
	1	9	51	42	4.75	8.6						767	8	
	1	9	54	45	4.40	11.2	2.2	2.5	2.4	4.4	7.1	745	19	
	1	9	54	45	4.47	8.5	1.8	1.3	1.9	3.8	5.1	705	11	

TD X  
L53 Az A/1  
Madurez  
alcanzada  
apro-  
ximadamente  
en el ciclo 40

continúa

FRT	nº	PDT	HDT	Ciclo	Color pulpa naranja 1 a 5	pH	Brix	GLU g/100 g	SUC g/100 g	FRU g/100 g	HEX g/100 g	Azúcar tot. g/100	Ac cítrico mg/100 g	Ac málico mg/100 g
	1	14	37	25	5.22	7.1	2.5	0.0	2.6	5.1	5.1	284	406	
	x2	10	37	27	4.38	5.9	2.1	0.0	1.8	6.7	3.9	513	146	
	x2	9	37	28	4.67	5.5	2.0	0.0	2.7	4.7	4.7	530	93	
	x2	9	37	28	4.37	6.2	2.1	0.0	2.0	4.0	4.1	695	104	
	1	19	47	28	5.23	5.8	1.9	0.6	3.1	5.0	5.6	410	0	
	1	9	37	28	4.65	7.2	2.8	0.0	3.4	6.2	6.2	594	22	
	x2	9	40	31	4.66	7.0	2.0	0.4	2.8	4.8	5.2	490	12	
	1	9	40	31	4.50	7.4	2.3	0.1	2.8	5.1	5.2	635	36	
	x2	9	40	31	4.32	5.9	2.2	0.0	2.1	4.0	4.3	495	102	
TD X	x2	9	44	35	4.39	7.3	2.7	0.3	2.4	4.2	5.4	579	55	
L53 Az A/1	1	9	44	35	4.62	9.2	2.5	1.2	3.0	5.5	6.7	689	0	
Madurez	1	9	44	35	4.39	8.4	3.0	0.0	3.5	6.7	6.6	685	55	
alcanzada	x2	9	44	35	4.41	8.8	3.0	0.3	3.0	5.4	6.3	702	27	
apro-	1	9	44	35	4.77	9.6	2.7	1.6	3.4	6.2	7.8	736	4	
ximadamente en el ciclo 40	x2	9	44	35	5.85	8.0	1.9	3.1	3.4	5.3	8.4	387	0	

continúa

FRT	nr	PDT	HDT	Ciclo	Color pulpa naranja 1 a 5	pH	Brix	GLU g/100 g	SUC g/100 g	FRU g/100 g	HEX g/100 g	Azúcar tot. g/100	Ac cítrico mg/100 g	Ac málico mg/100 g
	x2	10	37	27	4.55	7.0	2.7	0.0	3.1	5.7	5.8	543	24	
	x2	10	37	27	4.52	7.6	2.8	0.0	3.1	6.0	5.9	640	64	
	1	9	37	28	5.46	8.3	2.2	1.1	2.9	4.9	6.2	457	166	
	x2	9	37	28	4.40	6.1	2.5	0.0	2.5	4.4	5.0	630	64	
	1	9	37	28	4.67	9.4	2.9	2.5	4.1	7.0	9.5	618	30	
	1	10	40	30	4.71	9.5	3.1	1.3	3.3	6.4	7.7	610	54	
	x2	9	40	31	4.51	6.6	2.4	0.0	2.7	5.2	5.1	460	64	
	x2	9	40	31	4.62	7.7	3.0	0.0	3.2	6.1	6.1	569	50	
	x2	9	40	31	4.58	7.6	2.7	0.0	3.2	5.2	6.0	655	41	
	x2	9	40	31	4.48	8.3	2.9	0.0	3.4	2.6	6.3	721	48	
TD X	1	10	44	34	4.76	11.2	3.4	1.0	4.0	7.2	8.5	844	74	
L53 Az A/1	1	10	44	34	4.69	13.1	3.1	3.1	3.9	9.7	10.0	825	90	
Madurez	1	17	51	34	4.72	10.1						612	22	
alcanzada	x2	10	44	34	4.48	12.1	3.4	2.0	4.0	6.7	9.4	683	64	
apro-	1	9	44	35	4.66	13.0	3.3	4.2	3.5	6.8	11.0	733	42	
ximadamente	1	9	47	38	5.22	14.4	2.6	5.9	3.0	5.6	11.4	514	87	
en el ciclo 40	1	9	47	38	4.50	13.2	3.1	4.1	3.1	5.8	10.3	899	80	
	x2	9	47	38	4.89	12.4	2.2	4.1	3.2	6.7	9.5	696	21	
	1	9	47	38	4.57	14.2	3.3	4.3	3.3	6.2	10.9	725	66	
	1	9	47	38	4.66	15.2	2.8	5.7	2.9	4.8	11.4	774	141	
	x2	10	51	41	4.67	15.2						818	44	
	x2	9	51	42	4.74	13.6						754	65	
	1	9	51	42	4.97	15.4	2.1	7.0	2.6	4.7	11.7	507	1	
	1	9	51	42	5.60	15.2	2.0	8.6	2.3	4.3	12.9	462	97	
	1	11	54	43	4.94	15.8	2.9	6.0	2.8	8.1	11.7	680	66	
	x2	9	53	44	4.93	15.1						881	221	
	x2	9	54	45	4.80	15.3	2.3	7.4	2.7	5.1	12.4	831	103	
	x2	9	54	45	4.53	14.1	2.7	5.2	2.8	5.2	10.8	876	64	
	1	9	54	45	5.00	15.8	2.8	6.3	2.5	4.8	11.6	641	188	

## ES 2 313 273 T3

### Ejemplo 16

#### *Evolución de las características del fruto después de la recolección*

- 5 A. Frutos de plantas de la prueba SP03OF (véanse las Tablas 6 y 7C) se recolectaron y almacenaron durante 1 semana a 12°C, seguido de 3 días a 20°C o durante 6 semanas a 12°C, seguido de 2 días a 20°C. Las características de los frutos se midieron después de almacenamiento y se indican en la Tabla 18.
- 10 B. Las plantas se dejaron desarrollaron como en el caso de las plantas de la Tabla 14 anterior. Los frutos se recolectaron y guardaron durante 1 semana a 12°C, seguido de 3 días a 20°C. Las características de los frutos se midieron después del almacenamiento y se muestran en la Tabla 19.

15

(Tabla pasa a página siguiente)

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 18

Protocolo Después de la cosecha	Hv	FRT									
		Nr	Brix	pH	Glu g/100 g	Suc g/100 g	Fru g/100 g	Hex g/100 g	Total Azúcar mg/100 g	Cítrico mg/100 g	Málico mg/100 g
Millenium	Med.	5	8.4	5.75	2.0	2.3	2.2	4.2	6.4	441	-8
	dev. est.		0.3	0.05	0.11	0.2	0.0	0.1	0.2	25	4
	Med.	2	10.1	5.86	1.5	3.9	2.2	3.7	7.6	487	
	dev. est.		0.6	0.03	0.3	0.9	0.2	0.5	0.4	4	
YUSOL 1/y 2 X SOLAZ/1	Med.	4	12.0	4.71	1.0	6.7	2.1	3.1	9.8	802	-1
	dev. est.		0.7	0.05	0.1	0.7	0.1	0.2	0.7	33	6
	Med.	2	13.2	4.77	0.5	8.1	1.8	2.3	10.4	808	
	dev. est.		0.5	0.07	0.1	0.6	0.0	0.1	0.5	36	
YUSOL/3 X SOLAZ/1	Med.	4	11.9	4.89	1.1	6.2	1.9	3.0	9.2	638	
	dev. est.		0.9	0.07	0.4	1.6	0.3	0.7	1.1	72	
	Med.	9	9.5	4.46	1.0	4.5	1.9	2.9	7.4	773	-5
	dev. est.		1.4	0.12	0.2	1.5	0.2	0.4	1.2	85	5
YUSOL/3 X SOLAZ/1	Med.	4	9.5	4.65	1.1	3.7	2.0	3.1	6.7	669	
	dev. est.		1.4	0.17	0.2	1.4	0.3	0.5	1.0	70	
	Med.	5	10.1	4.53	1.1	4.9	2.1	3.2	8.2	789	3
	dev. est.		2.3	0.13	0.2	2.3	0.2	0.3	2.1	95	
YUSOL/3 X SOLAZ/1	Med.	2	10.6	4.70	1.1	5.5	2.0	3.1	8.6	697	
	dev. est.		0.7	0.02	0.1	0.6	0.1	0.2	0.4	51	
	Med.	12	10.4	4.50	0.9	5.8	1.8	2.7	8.4	777	-4
	dev. est.		0.8	0.09	0.2	0.9	0.1	0.3	0.8	37	6
YUSOL/3 X SOLAZ/1	Med.	6	11.0	4.85	0.6	6.2	1.5	2.1	8.3	656	
	dev. est.		0.8	0.14	0.3	1.1	0.3	0.6	0.7	46	
	Med.										
	dev. est.										

65	60	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5	FRT		Málico		Cítrico		Málico			
													Nr	Brix pH	Glu g/100 g	Suc g/100 g	Fru g/100 g	Hex g/100 g	Total Azúcar	mg/100 g	mg/100 g	mg/100 g
Protocolo			Hv																			
YUSOL/1 X SOLAZ/2	1 sem 12° + 3d 20° 6 sem 12° + 2d 20°	Med.	9.5	4.46	1.0	4.5	1.9	2.9	7.4	773	-5											
		Dev. std.	1.4	0.12	0.2	1.5	0.2	0.4	1.2	85	5											
YUSOL 1/2 X SOLAZ/2	1 sem 12° + 3d 20° 6 sem 12°+2d 20°	Med.	9.5	4.65	1.1	3.7	2.0	3.1	6.7	669												
		Dev. std.	1.4	0.17	0.2	1.4	0.3	0.5	1.0	70												
YUSOL/3 X SOLAZ/2	1 sem 12° + 3d 20° 6 sem 12° + 2d 20°	Med.	10.1	4.53	1.1	4.9	2.1	3.2	8.2	789	3											
		Dev. std.	2.3	0.13	0.2	2.3	0.2	0.3	2.1	95												
YUSOL/3 X SOLAZ/2	1 sem 12° + 3d 20° 6 sem 12° + 2d 20°	Med.	10.6	4.70	1.1	5.5	2.0	3.1	8.6	697												
		Dev. std.	0.7	0.02	0.1	0.6	0.1	0.2	0.4	51												
YUSOL/3 X SOLAZ/2	1 sem 12° + 3d 20° 6 sem 12° + 2d 20°	Med.	10.4	4.50	0.9	5.8	1.8	2.7	8.4	777	-4											
		Dev. std.	0.8	0.09	0.2	0.9	0.1	0.3	0.8	37	6											
YUSOL/3 X SOLAZ/2	1 sem 12° + 3d 20° 6 sem 12° + 2d 20°	Med.	11.0	4.85	0.6	6.2	1.5	2.1	8.3	656												
		Dev. std.	0.8	0.14	0.3	1.1	0.3	0.6	0.7	46												

Tabla 19

	FRT	Brix	pH	Glu g/100 g	Suc g/100 g	Fru g/100 g	Azúcar tot g/100 g	Ac. cítrico mg/100 g	Ac. málico mg/100 g	Relación Ac. cítrico/Ac. málico
SOLAZ/2 YUSOL/3	X 51	13,1	4,75	1,4	7,2	2,0	10,6	771	23	35
SOLAZ/1 YUSOL/1	X 51	13,8	4,71	1,8	7,9	2,3	12,0	778	21	53
YUSOL/1X SOLAZ/1 básico	51	13,4	6,14	1,4	8,0	2,3	11,7	354	14	31
Mehary	10	14,8	6,51	0,5	10,4	1,3	12,2	289	73	4
MEHARI FEMENINA X L53 AZIA	59	12,4	5,45	0,8	7,4	1,4	9,7	491	211	2
TD x L53 AZIA	49	13,9	5,16	0,6	9,0	1,3	10,9	579	69	11

## ES 2 313 273 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta de *C. melo* capaz de producir fruto, en donde dicho fruto comprende en la madurez:
- a) 400 mg a 1200 mg de ácido cítrico por 100 g de pf;
  - b) pH de 4,2 a 5,6;
  - 10 c) 5,0 a 15,0 g de azúcar por 100 g de pf; y
- en donde la relación de ácido cítrico a ácido málico en dicho fruto es mayor que 5.
- 15 2. La planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho fruto comprende 400 mg a 1000 mg de ácido cítrico por 100 g de pf.
3. La planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho fruto comprende 450 mg a 950 mg de ácido cítrico por 100 g de pf.
- 20 4. La planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho fruto comprende 475 mg a 900 mg de ácido cítrico por 100 g de pf.
- 25 5. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho pH es 4,3 a 5,4.
6. La planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho pH es 4,4 a 5,1.
- 30 7. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho fruto comprende 5,5 g a 13,0 g de azúcar por 100 g de pf.
8. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho fruto comprende 7,0 g a 15,0 g de azúcar por 100 g de pf.
- 35 9. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho fruto comprende menos de 85 mg de ácido málico por 100 g de pf.
- 40 10. La planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho fruto comprende menos de 75 mg de ácido málico por 100 g de pf.
11. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la relación de ácido cítrico a ácido málico en dicho fruto es mayor que 10.
- 45 12. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el pH de dicho fruto se mantiene dentro de dicho intervalo de 4,2 a 5,6 cuando dicho fruto se recolecta y se mantiene en almacenamiento durante al menos 5 días a 20°C o durante al menos 7 días a 8-12°C, seguido de 3 días a 20°C.
- 50 13. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el ácido cítrico de dicho fruto se mantiene en o por encima de 400 mg por 100 g de pf cuando dicho fruto se recolecta y se mantiene en almacenamiento durante al menos 5 días a 20°C o durante al menos 7 días a 8-12°C seguido por 3 días a 20°C.
- 55 14. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la relación de ácido cítrico a ácido málico de dicho fruto se mantiene por encima de 5 cuando dicho fruto se recolecta y se mantiene en almacenamiento durante al menos 5 días a 20°C o durante al menos 7 días a 8-12°C, seguidos de 3 días a 20°C.
15. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicha planta es capaz de producir un fruto poco crítico o no crítico.
- 60 16. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde dicha planta es capaz de producir un fruto poco climatérico o no climatérico.
17. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la pulpa de dicho fruto es naranja, blanca, verde o amarilla.
- 65 18. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el mesocarpio de dicho fruto representa más de 50% del peso fresco total de dicho fruto.

## ES 2 313 273 T3

19. La planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el rasgo de pH bajo puede obtenerse a partir de una planta de la línea IND-35, semillas representativas de la cual se han depositado bajo el número de Acceso NCIMB41202, o un descendiente de dicha línea IND-35.
- 5 20. La planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho fruto comprende en la madurez:
- a) 600 mg a 1200 mg de ácido cítrico por 100 g de pf;
  - b) pH de 4,2 a 5,1;
  - 10 c) 5,0 g a 15,0 g de azúcar por 100 g de pf,
- en donde la relación de ácido cítrico a ácido málico en dicho fruto es mayor que 6.
- 15 21. La planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicho fruto comprende 600 mg a 1000 mg de ácido cítrico por 100 g de pf.
22. La planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho fruto comprende 650 mg a 950 mg  
20 de ácido cítrico por 100 g de pf.
23. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en donde dicho pH es 4,4 a 5,0.
- 25 24. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en donde dicho fruto comprende 7,0 g a 13,0 g de azúcar por 100 g de pf.
25. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, en donde dicho fruto  
30 comprende menos de 85 mg de ácido málico por 100 g de pf.
26. La planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 25, en donde dicho fruto comprende menos de 75 mg de ácido málico por 100 g de pf.
- 35 27. La planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 26, en donde dicho fruto comprende menos de 60 mg de ácido málico por 100 g de pf.
28. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 27, en donde la relación de ácido cítrico a ácido málico en dicho fruto es mayor que 7.
- 40 29. La planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 28, en donde la relación de ácido cítrico a ácido málico en dicho fruto es mayor que 10.
30. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en donde dicha planta es un híbrido.
- 45 31. La planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en donde dicha planta es un dihaploide.
32. Semilla de una planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en donde dicha  
50 semilla, cuando se desarrolla para producir una planta, exhibe las características distintivas de una planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31.
33. Fruto de una planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31.
- 55 34. Pulpa de una planta de *C. melo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31.
35. Uso del fruto de una planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 33 en un producto cortado fresco.
- 60 36. Uso de la pulpa de una planta de *C. melo* de acuerdo con la reivindicación 34 en un producto cortado fresco.

# ES 2 313 273 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Syngenta Participacions AG  
5 <120> Nuevas Plantas de Melón  
<130> 70317 WOPCT
- <140>  
10 <141>
- <150> US 60/535.631  
<151> 2004-01-09
- 15 <150> ES 200400473  
<151> 2004-02-27
- 20 <160> 6
- <170> PatentIn Ver 2.1
- 25 <210> 1  
<211> 20  
<212> UNA  
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido
- 35 <400> 1  
**aagtcacacca ccaccogtaa** 20
- <210> 2  
40 <211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- 45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido
- <400> 2  
50 **gtgaatggta tgttatcctt g** 21
- <210> 3  
<211> 19  
55 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- <220>  
60 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido
- <400> 3  
65 **gtatcatgtc ggagaaacg** 19
- <210> 4  
<211> 19

## ES 2 313 273 T3

<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido

<400> 4

10 **ccctttatccc caactttttc** **19**

<210> 5  
<211> 19

15 <212> DNA  
<213>

<220> Secuencia Artificial  
20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido

<400> 5

25 **ttcttcgatg tgtctctc** **19**

<210> 6  
<211> 19  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido

35 <400> 6

**gtcgccttggg atatctogg** **19**

40

45

50

55

60

65