

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 724**

51 Int. Cl.:

A01H 5/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2005** **E 05849952 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2014** **EP 1816908**

54 Título: **Planta de sandía con múltiples ramificaciones y método de producción**

30 Prioridad:

30.11.2004 US 999650

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

14.05.2014

73 Titular/es:

HM.CLAUSE, INC. (100.0%)
555 Codoni Avenue
Modesto CA 95357 , US

72 Inventor/es:

LANINI, BRENDA;
COPEs, BILL y
SUPERAK, THEODORE, H.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 460 724 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

Planta de sandía con múltiples ramificaciones y método de producción

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un alelo de sandía denominado "HMBN", que da como resultado plantas compactas con múltiples ramificaciones y pequeño fruto. La presente invención también se refiere a una semilla de sandía, a una planta de sandía y a partes de una planta de sandía, a una variedad de sandía y a un híbrido de sandía que comprende el alelo mutante. Además, la presente invención se refiere a la transferencia del alelo HMBN en la planta de sandía a otras variedades y especies de sandía, y es útil para producir nuevos tipos y variedades de sandía con múltiples ramificaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un alelo mutante de sandía nuevo y diferente, denominado "HMBN". Hay numerosas etapas en el desarrollo de cualquier germoplasma vegetal nuevo y deseable. La reproducción vegetal comienza con el análisis y definición de problemas y debilidades del germoplasma actual, el establecimiento de metas de programa, y la definición de objetivos de reproducción específicos. La siguiente etapa es la selección de germoplasma que posea los rasgos para satisfacer las metas del programa. La meta es combinar en una única variedad o híbrido una combinación mejorada de rasgos deseables del germoplasma progenitor. Estos rasgos importantes pueden incluir mayor rendimiento, comportamiento de campo, calidad del fruto y agronómica tal como firmeza, color, contenido en sólidos solubles, acidez y viscosidad, resistencia a enfermedades e insectos, y tolerancia a la sequía y al calor.

Todas las formas cultivadas de sandía pertenecen a la especie polimórfica *Citrullus lanatus* que se hace crecer por su fruto comestible que pesa de cinco a cuarenta libras, dependiendo de la variedad. Como cosecha, las sandías se hacen crecer comercialmente siempre que las condiciones medioambientales permitan la producción de un rendimiento económicamente viable. En los Estados Unidos de América, las áreas principales de producción de sandías son Florida, Georgia, Texas y California. La sandía fresca se come en rodajas o en cubitos, y también se puede usar como ingrediente en alimentos preparados.

Se piensa que la sandía es originaria de la parte sur de África debido a que se encuentra creciendo salvaje por todo el área, y alcanza allí la máxima diversidad de formas. Se ha cultivado en África durante 4.000 años. Se considera que *Citrullus colocynthis* es un ancestro salvaje de la sandía. Tiene frutos que son pequeños, con un diámetro máximo de 75 mm, con una carne amarga y semillas marrones pequeñas. Aunque la especie *Citrullus* crece salvaje en la parte sur y central de África, *C. colocynthis* también crece de forma salvaje en la India. El cultivo de la sandía comenzó en el Egipto antiguo y en la India, y se piensa que se ha extendido desde esos países a través del Mediterráneo, Oriente Próximo, y Asia. La cosecha se ha hecho crecer en los Estados Unidos de América desde 1629.

Citrullus lanatus es un miembro de la familia de las cucurbitáceas que consiste en alrededor de 90 géneros y 700 a 760 especies, la mayoría de ellas tropicales. La familia incluye calabazas, calabacines, calabacinos, sandía, esponja de lufa, y varias malas hierbas. Hay cuatro especies reconocidas de *Citrullus*, *C. lanatus*, *C. colocynthis*, *C. rehmii* y *C. ecirrhosus*; todas ellas tienen 22 cromosomas, y se pueden cruzar entre sí con éxito.

C. lanatus es una sandía anual. Tiene hojas verdes anchas y grandes, que tienen forma esférica a triangular-ovoide y profundamente tri a pentalobulado, o algunas veces simple. Las flores de tamaño medio son monoicas, y tienen pedicelos cortos. Los frutos tienen un tamaño medio a grande, con piel gruesa y carne sólida con un contenido elevado de agua. El color de la carne puede ser rojo, amarillo, o blanco. Las semillas son ovoides a oblongas, están fuertemente comprimidas, y tienen revestimientos de semillas blancos o marrones. El sistema de raíz de la planta es un sistema de semi-raíz primaria fibroso profundo que se disemina y que se extiende seis pies o más por debajo de la superficie del suelo.

C. colocynthis es una sandía perenne. Difiere de *C. lanatus* principalmente en el tamaño de los órganos vegetales. Las hojas son pequeñas con lóbulos estrechos, y son pilosas y de color grisáceo. Las flores son monoicas y pequeñas. La floración es profusa en otoño, cuando también se produce el crecimiento vegetativo reciente. Las semillas son pequeñas y marrones. Los frutos son pequeños, no superando las 3 pulgadas de diámetro, con una piel y una carne esponjosa que son siempre amargas.

C. ecirrhosus es una sandía perenne. *C. ecirrhosus* se asemeja mucho a *C. colocynthis* en las características vegetativas, pero sus hojas están más divididas, están cubiertas con pelos densos finos, y tienen márgenes muy recurvados. Carece de zarcillos. Los frutos son subglobosos con pulpa blanca, y son amargos como *C. colocynthis*. Las flores no se producen hasta el segundo año de crecimiento.

Las plantas de sandía comerciales son monoicas, produciendo tanto flores masculinas como femeninas. Una flor femenina se puede reconocer fácilmente por el hinchamiento de su base, que se asemeja a una sandía pequeña. Las abejas, principalmente en la mañana, polinizan las flores. Hay muchas variedades de cultivo diversas para la

producción, teniendo las variedades una coloración de la piel desde verde oscuro hasta amarilla, con una coloración a rayas o maciza, y que contienen semillas o carecen de semillas. La forma del fruto varía desde redonda a elíptica.

Las variedades de sandía caen en tres clases amplias, según cómo se desarrolló la semilla: polinizada abierta, híbrido F_1 y triploide (denominada habitualmente como sin semilla). Las variedades polinizadas abiertas se desarrollan a lo largo de varias generaciones de selección. La selección se puede basar en el rendimiento, características de calidad y resistencia a enfermedades. Los híbridos F_1 se desarrollan a partir de dos estirpes endogámicas que se han autofecundado durante varias generaciones y después se han cruzado. La semilla del híbrido F_1 muestra una mayor uniformidad de tipo y tiempo de cosecha en comparación con la semilla polinizada abierta, y puede mostrar un incremento tanto como del 20 por ciento al 40 por ciento en rendimientos con respecto a las variedades polinizadas abiertas que se hicieron crecer en condiciones similares. El tercer tipo es la sandía triploide o sin semillas. Éstas se desarrollan creando plantas de sandía con el doble del número de cromosomas habitual y cruzándolas con plantas de sandía normales. Las plantas resultantes tienen una vez y media el número de normal cromosomas. Debido a que tienen un número impar de cromosomas, no pueden formar semillas viables. Aunque a las sandías triploides se las denomina sin semillas, verdaderamente no son sandías sin semilla, sino que más bien tienen semillas sin desarrollar que son blandas y comestibles.

La elección de los métodos de reproducción o de selección depende del modo de reproducción vegetal, de la capacidad para heredar el rasgo o rasgos que se mejoran, y del tipo de variedad de cultivo usado comercialmente (por ejemplo, variedad de cultivo de híbrido F_1 , variedad de cultivo pureline, etc.). Para rasgos muy heredables, será eficaz una elección de plantas individuales superiores evaluadas en una única localización, mientras que para rasgos con una baja capacidad de ser heredables, la selección se debería basar en valores medios obtenidos a partir de evaluaciones repetidas de familias de plantas relacionadas. Los métodos de selección populares incluyen habitualmente la selección por pedigrí, selección por pedigrí modificada, selección por masa, y selección recurrente.

La complejidad de la herencia influye en la elección del método de reproducción. La reproducción por retrocruzamiento se usa para transferir uno o unos pocos genes favorables para un rasgo muy heredable en una variedad de cultivo deseable. Este enfoque se ha usado ampliamente para reproducir variedades de cultivo resistentes a enfermedades. Para mejorar rasgos heredados cuantitativamente controlados por numerosos genes, se usan diversas técnicas de selección recurrente. El uso de selección recurrente en cosechas autopolinizantes depende de la facilidad de polinización, de la frecuencia de híbridos exitosos procedentes de cada polinización, y del número de descendientes híbridos procedentes de cada cosecha con éxito.

Cada programa de reproducción debería incluir una evaluación objetiva, periódica, de la eficiencia del procedimiento de reproducción. Los criterios de evaluación varían dependiendo de la meta y de los objetivos, pero deberían incluir la ganancia de selección por año en base a comparaciones con un estándar apropiado, valor global de las estirpes de reproducción avanzadas, y el número de variedades de cultivo con éxito producidas por unidad de entrada (por ejemplo, por año, por dólar gastado, etc.).

Se están ensayando a conciencia estirpes de reproducción avanzadas prometedoras, y se comparan con estándar apropiados en entornos representativos del área o áreas diana comerciales durante al menos tres años. Las mejores estirpes son candidatos para nuevas variedades de cultivo comerciales; aquellas todavía deficientes en unos pocos rasgos se usan como progenitoras para producir nuevas poblaciones para una selección posterior.

Estos procesos, que conducen a la etapa final de comercialización y distribución, habitualmente tardan de ocho a 12 años desde el momento en que se realiza el primer cruce. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas variedades de cultivo es un proceso que consume tiempo, que requiere una planificación directa precisa, un uso eficiente de fuentes, y un mínimo de cambios en la dirección.

Una tarea muy difícil es la identificación de individuos que son genéticamente superiores, debido a que, para la mayoría de los rasgos, el valor genotípico verdadero está enmascarado por otros rasgos vegetales o factores medioambientales confundentes. Un método para identificar una planta superior es observar su comportamiento con respecto a otras plantas experimentales y con respecto a una variedad de cultivo estándar que se hace crecer ampliamente. Si una única observación no es concluyente, las observaciones repetidas proporcionan una mejor estimación de su valor genético.

La meta de la reproducción de plantas de sandía es desarrollar líneas endogámicas e híbridos de sandía nuevos, únicos y superiores. El reproductor selecciona y cruza inicialmente dos o más estirpes progenitoras, seguido de la autofecundación repetida y selección, produciendo muchas combinaciones genéticas nuevas. El reproductor puede generar teóricamente miles de millones de combinaciones genéticas diferentes vía el cruzamiento, autopolinización y mutaciones. El reproductor no tiene control directo a nivel celular. Por lo tanto, dos reproductores nunca desarrollarán la misma estirpe, o incluso estirpes muy similares, que tengan los mismos rasgos de la sandía.

Cada año, el reproductor vegetal selecciona el germoplasma a avanzar a la siguiente generación. Este germoplasma se hace crecer en condiciones geográficas, climáticas y de suelo únicas y diferentes, y entonces se realizan selecciones adicionales, durante y al final de la estación de crecimiento. Las variedades que se desarrollan son impredecibles. Esta impredecibilidad es debido a que la selección del reproductor se produce en entornos únicos, sin

control a nivel del ADN (usando procedimientos de reproducción convencionales), y generándose millones de diferentes combinaciones genéticas posibles. Un reproductor de pericia normal en la técnica no puede predecir las estirpes resultantes finales que ha desarrollado, excepto posiblemente de manera muy grosera y general. El mismo reproductor no puede reproducir la misma estirpe dos veces usando exactamente los mismos progenitores originales y las mismas técnicas de selección. Esta impredecibilidad da como resultado el gasto de grandes cantidades de investigación para desarrollar nuevas variedades de sandía superiores.

El desarrollo de híbridos de sandía comerciales requiere el desarrollo de estirpes endogámicas homocigotas, el cruzamiento de estas estirpes, y la evaluación de los cruces. Para desarrollar estirpes a partir de poblaciones de reproducción, se usan métodos de reproducción mediante selección de pedigrí, de retrocruzamiento o selección recurrente. Los programas de reproducción combinan rasgos deseables de dos o más estirpes o diversas fuentes de amplia base en conjuntos de reproducción a partir de los cuales se desarrollan alelos mutantes mediante autofecundación y selección de fenotipos deseados. Las nuevas líneas endogámicas se cruzan con otras líneas endogámicas, y los híbridos procedentes de estos cruces se evalúan para determinar cuáles tienen potencial comercial.

La reproducción de pedigrí se usa habitualmente para la mejora de cosechas autofecundantes o progenitores endogámicos de cosechas de polinización cruzada. Se cruzan dos progenitores que poseen rasgos complementarios favorables para producir una F_1 . Una población F_2 se produce autofecundando una o varias F_1 o intercruzando dos F_1 (emparejamiento de familiares). La selección de los mejores individuos comienza habitualmente en la población F_2 ; entonces, comenzando en la F_3 , se seleccionan los mejores individuos en las mejores familias. El ensayo repetido de las familias, o combinaciones de híbridos implican individuos de estas familias, continúa a menudo en la generación F_4 para mejorar la eficacia de selección para rasgos con poca capacidad para ser heredados. En una etapa avanzada de la endogamia (es decir, F_6 y F_7), se ensayan las mejores líneas o mezclas de líneas fenotípicamente similares para la liberación potencial como nuevas variedades de cultivo o nuevos progenitores para híbridos.

Para mejorar poblaciones de cosechas autopolinizantes o de polinización cruzada, se pueden usar selecciones de masas y recurrentes. Una población genéticamente variable de individuos heterocigotos se identifica o se crea intercruzando varios progenitores diferentes. Las mejores plantas se seleccionan basándose en la superioridad del individuo, progenie sobresaliente, o excelente capacidad de combinación. Las plantas seleccionadas se inter cruzan para producir una nueva población en la que se continúan ciclos adicionales de selección.

La reproducción por retrocruzamiento se ha usado para transferir genes para un rasgo heredado simplemente, muy heredable, en una variedad de cultivo o línea endogámica homocigota deseable que es el progenitor recurrente. La fuente del rasgo a transferir se denomina el progenitor donante. Se espera que la planta resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, variedad de cultivo) y el rasgo deseable transferido a partir del progenitor donante. Tras el cruce inicial, los individuos que poseen el fenotipo del progenitor donante se seleccionan y se cruzan repetidamente (se retro cruzan) hasta el progenitor recurrente. Se espera que la planta resultante tenga los atributos del progenitor recurrente (por ejemplo, variedad de cultivo) y el rasgo deseable transferido desde el progenitor donante.

La reproducción de mutación es otro método para introducir nuevos rasgos en variedades de sandía. Las mutaciones que se producen espontáneamente o son inducidas artificialmente pueden ser fuentes útiles de variabilidad para un reproductor vegetal. La meta de la mutagénesis artificial es incrementar la tasa de mutación para una característica deseada. Las tasas de mutaciones se pueden incrementar por muchos medios diferentes, incluyendo temperatura, almacenamiento de semillas a largo plazo, condiciones del cultivo tisular, radiación (tal como rayos X, rayos gamma, neutrones, radiación beta, o radiación ultravioleta), mutágenos químicos (tales como análogos de bases como 5-bromo-uracilo), antibióticos, agentes alquilantes (tales como mostazas de azufre, mostazas de nitrógeno, epóxidos, etilenaminas, sulfatos, sulfonatos, sulfonas, o lactonas), azida, hidroxilamina, ácido nitroso o acridinas. Una vez que se observa un rasgo deseado mediante mutagénesis, el rasgo se puede incorporar entonces en el germoplasma existente mediante técnicas de reproducción tradicionales. Los detalles de la reproducción de mutación se pueden encontrar en "Principles of Cultivar Development" por Feht, Macmillan Publishing Company, 1993.

La reproducción de mutación incluye agentes que duplican el cromosoma, tales como colchicina química, que inhibe la formación de microtúbulos durante la división celular. Cuando se tratan con colchicina, los cromosomas celulares son copiados en preparación para la mitosis como normales, pero la falta de microtúbulos evita la escisión celular. El resultado es una célula sin dividir que contiene el doble del complemento normal de los cromosomas del organismo. La célula tratada con colchicina se regenera entonces en una planta completa en la que cada célula tiene duplicado sus cromosomas. Si un individuo con cromosomas desemparejados se trata con colchicina, sus cromosomas se duplicarán, creando así un cromosoma parejo que es capaz de emparejarse apropiadamente durante la reproducción sexual. El procedimiento puede restaurar la fertilidad a un individuo primitivamente estéril, y la planta anfidiplóide recientemente fértil puede producir entonces descendencia segregante que se puede observar en busca de rasgos adicionales. La colchicina también se puede usar para duplicar el número de cromosomas de una planta cultivada normal, de manera que la planta puede combinarse fácilmente con otra planta que tiene un número diferente de cromosomas.

Las descripciones de otros métodos de reproducción que se usan normalmente para rasgos y cosechas diferentes se pueden encontrar en uno de los varios libros de referencia (por ejemplo, Principles of Plant Breeding, John Wiley and Son, p. 115-161, 1960; Allard, 1960; Simmonds, 1979; Snee et al., 1979; Fehr, 1987).

El ensayo apropiado debería detectar cualquier fallo principal y establecer el nivel de superioridad o mejora con respecto a las variedades de cultivo actuales. Además de mostrar un comportamiento superior, debe haber una demanda de una nueva variedad de cultivo que sea compatible con los estándares de la industria o que cree un nuevo mercado. La introducción de una nueva variedad de cultivo provocará costes adicionales al productor de semillas, al desarrollador, al procesador y al consumidor, por una comercialización y publicidad especial, prácticas de producción comercial y semillas alteradas, y nueva utilización del producto. La liberación precedente de ensayo de una nueva variedad de cultivo debería tener en consideración los costes de investigación y de desarrollo, así como la superioridad técnica de la variedad de cultivo final. Para variedades de cultivo propagadas por semillas, debe ser factible producir fácil y económicamente las semillas.

Una vez que se han identificado las líneas endogámicas que dan el mejor comportamiento de híbridos, la semilla híbrida se puede reproducir indefinidamente en tanto que se mantenga la homogeneidad del progenitor endogámico. Un híbrido de un solo cruce se produce cuando dos líneas endogámicas se cruzan para producir la progenie F_1 .

La sandía se ha mejorado mediante domesticación y reproducción vegetal formal a partir de una cepa de madurez tardía con pequeño fruto que tiene pulpa dura blanca y un sabor blando o amargo, en una planta de maduración temprana, más compacta, con gran fruto con pulpa dulce comestible. En el último siglo, los reproductores vegetales que trabajan en programas públicos o privados en los Estados Unidos de América y alrededor del mundo han proporcionado variedades que tienen resistencia a enfermedades, enredaderas enanas, mayor fruto, mayor contenido de azúcares, mayor contenido de licopenos, capacidad para no tener semillas, y nuevos colores de la pulpa, tales como rojo oscuro, naranja y amarillo. Recientes avances en la reproducción de híbridos triploides sin semillas han dado como resultado una popularidad renovada de las sandías, y el consumo per cápita ha aumentado un 37% desde 1980.

Sin embargo, incluso con tal enorme diversidad, la mayoría de las plantas de sandía son grandes y producen grandes frutos que pesan de cinco a cuarenta libras, mientras que hay una demanda cada vez mayor de plantas y frutos más pequeños. Se han descubierto algunas plantas más pequeñas, y se ha identificado un gen, *dw-1*, que da como resultado un porte de planta enana, como un gen recesivo individual (Mohr, H.C., Proc. Assoc. Southern Agric. Work., 53:174 (1956)). Otro gen de enanismo recesivo individual, *dw-2*, que controla la ramificación múltiple desde la corona de la planta, se identificó en 1975 (Mohr, H.C. y M.S. Sandhu, J. Am. Soc. Hortic. Sci. 100:135-137).

Estos genes del enanismo se aplican solamente a la planta y no al fruto, dando como resultado un fruto grande en plantas pequeñas. Ha sido muy difícil para los reproductores de sandías desarrollar plantas pequeñas con pequeño fruto y un rendimiento comercialmente aceptable. Inesperadamente, el alelo HMBN de la presente invención da como resultado tanto plantas pequeñas como frutos más pequeños con un rendimiento comercialmente aceptable.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un nuevo alelo derivado de *Citrullus lanatus* que es expresado fenotípicamente mediante la formación de plantas compactas y frutos más pequeños cuando está presente en el estado homocigoto. Se ha determinado que este alelo mutante es un gen recesivo individual. La invención proporciona así plantas, semillas, frutos y otras partes vegetales, tales como polen y óvulos, que contienen el alelo mutante.

La invención también se refiere a métodos para introducir el alelo en plantas cruzando una variedad que carece del alelo mutante con una variedad que tiene el alelo, retrocruzando la progenie con la variedad que carece del alelo mutante, autofecundando las generaciones resultantes y seleccionando entonces las plantas que muestran una planta compacta y un fruto más pequeño.

La invención también se refiere a un método para producir una semilla de *Citrullus lanatus* híbrida, que comprende cruzar un primer progenitor vegetal de la variedad de cultivo con un segundo progenitor vegetal de la variedad de cultivo y recolectar la semilla híbrida de *Citrullus lanatus* resultante, en el que ambos progenitores son variedades de cultivo que contienen el alelo mutante. Las semillas híbridas, la planta y sus partes, producidas por tal método, son parte de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a cualquier semilla o planta de sandía que tiene el alelo mutante HMBN.

En otro aspecto, la presente invención proporciona células regenerables para uso en cultivo tisular. El cultivo tisular será capaz preferiblemente de regenerar plantas que tienen las características fisiológicas y morfológicas de la planta de sandía endogámica anterior, y de regenerar plantas que tienen sustancialmente el mismo genotipo que la planta de sandía endogámica anterior. Preferiblemente, las células regenerables en tales cultivos tisulares serán embriones, protoplastos, células meristemáticas, callo, polen, hojas, anteras, tallos, pecíolos, raíces, puntas de raíces, frutos, semillas, flores, cotiledones, hipocotilos, o similares. Todavía más, la presente invención proporciona plantas de sandía regeneradas a partir de los cultivos tisulares de la invención.

5 En consecuencia, la invención proporciona una planta o semilla de sandía que contiene un alelo denominado HMBN, el cual, cuando está presente en forma homocigota, confiere un fenotipo de múltiple ramificación que comprende un número medio de ramas secundarias a 30 cm de más de 20,0 y un peso medio de fruto de menos de 1,5 kg, siendo obtenible dicha planta mediante un método que comprende cruzar una primera planta de sandía progenitora que contiene dicho alelo HMBN con una segunda planta de sandía progenitora; en el que una muestra representativa de la semilla que contiene dicho alelo HMBN se depositó con el número de acceso ATCC PTA-6300.

Esta planta o semilla puede contener un único alelo HMBN recesivo, o puede ser homocigota para dicho alelo HMBN. Las plantas de la invención pueden ser triploides.

10 La invención también proporciona polen o un óvulo de las plantas definidas anteriormente, que contiene dicho alelo HMBN.

La invención también proporciona un cultivo tisular de células de la planta definida anteriormente, en el que las células del cultivo tisular proceden de una parte vegetal seleccionada de embriones, células meristemáticas, callo, polen, hojas, anteras, tallos, pecíolos, raíces, puntas de raíces, frutos, semillas, flores, cotiledones, e hipocotilos, conteniendo dichas células de dicho cultivo tisular dicho alelo HMBN.

15 La invención también proporciona un protoplasto de la planta definida anteriormente, o del cultivo tisular definido anteriormente, conteniendo dicho protoplasto dicho alelo HMBN.

La invención también proporciona un método para producir una planta de sandía que tiene todas las características morfológicas y fisiológicas de una planta de sandía que contiene el alelo HMBN, regenerando dicha planta a partir del cultivo tisular definido anteriormente.

20 Las plantas de sandía de la invención que contienen dicho alelo HMBN pueden tener

- (a) un número medio de frutos mayor que 3,0;
- (b) un número medio de ramificaciones secundarias a 90 cm de más de 19,0;
- (c) una firmeza media del fruto de menos de 17,0 libras;
- (d) un número medio de flores masculinas mayor de 13,0 en el día 8;
- 25 (e) un número medio de flores masculinas mayor de 11,0 en el día 15; o
- (f) un número medio de flores masculinas mayor de 7,0 en el día 22.

La invención también proporciona fruto de las plantas definidas anteriormente que contiene el alelo HMBN como se define anteriormente.

DEFINICIONES

30 En la descripción y tablas que siguen, se usa un número de términos. A fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, incluyendo el alcance a dar a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones:

35 Alelo. "Alelo" es cualquiera de una o más formas alternativas de un gen, todos los cuales alelos están relacionados con un rasgo o característica. En una célula u organismo diploide, los dos alelos de un gen dado ocupan los loci correspondientes en un par de cromosomas homólogos.

Retrocruzamiento. Retrocruzamiento es un proceso en el que un reproductor cruza de forma repetida la progenie híbrida nuevamente con uno de los progenitores, por ejemplo un híbrido F₁ de primera generación con uno de los genotipos progenitores del híbrido F₁.

40 Longitud media del fruto. "Longitud media del fruto" significa la longitud media, en centímetros, de todos los frutos cosechados de una o más plantas de sandía de un genotipo específico.

Número medio de frutos. "Número medio de frutos" significa el número medio de frutos cosechado de una o más plantas de sandía de un genotipo específico.

Peso medio del fruto. "Peso medio del fruto" significa el peso medio, en kilogramos, de todos los frutos de una o más plantas de sandía de un genotipo específico.

45 Anchura media del fruto. "Anchura media del fruto" significa la anchura media, en centímetros, de todos los frutos cosechados de una o más plantas de sandía de un genotipo específico.

Longitud media internodal. "Longitud media internodal" significa la longitud media de los internodos de una planta de sandía de un genotipo específico, medida en centímetros.

Longitud media de la hoja. "Longitud media de la hoja" significa la distancia media de la hoja a lo largo del nervio central desde la punta hasta el comienzo del pecíolo.

Anchura media de la hoja. "Anchura media de la hoja" significa la distancia media de la parte más ancha de la hoja perpendicular al nervio central de la hoja.

5 Relación media de longitud a anchura (Relación L/W). "Relación media de longitud a anchura" (relación L/W) significa la relación media de longitud a anchura de todos los frutos cosechados de una o más plantas de sandía de un genotipo específico.

10 Longitud media de la ramificación más larga. "Longitud media de la ramificación más larga" significa la longitud media de la ramificación más larga de la planta de sandía, en centímetros, según se mide desde la corona de la planta.

Longitud media de la ramificación más corta. "Longitud media de la ramificación más corta" significa la longitud media de la ramificación más corta de la planta de sandía, en centímetros, según se mide desde la corona de la planta.

15 Número medio de flores femeninas. "Número medio de flores femeninas" significa el número medio de flores femeninas abiertas por planta en un día específico. El número de días se refiere al número de días desde la primera flor.

Número medio de flores masculinas. "Número medio de flores masculinas" significa el número medio de flores masculinas abiertas por planta en un día específico. El número de días se refiere al número de días desde la primera flor.

20 Número medio de ramificaciones secundarias a 30 cm. "Número medio de ramificaciones secundarias a 30 cm" significa el número medio de ramificaciones secundarias, medido a 30 centímetros desde la corona de la planta de sandía de un genotipo específico.

25 Número medio de ramificaciones secundarias a 90 cm. "Número medio de ramificaciones secundarias a 90 cm" significa el número medio de ramificaciones secundarias, medido a 90 centímetros desde la corona de la planta de sandía de un genotipo específico.

Agente que duplica el cromosoma. Uno cualquiera de un número de inhibidores mitóticos, incluyendo colchicina, orizalina, trifluralina, amipfos-metilo, y gas N₂O.

30 Colchicina. Colchicina es un alcaloide preparado de los cormos y semillas de *Colchicum autumnale*, el cóllico de otoño. Normalmente después de que una célula ha copiado sus cromosomas en preparación para la división celular, se forma el husillo, se une a los cromosomas y mueve el cromosoma a los lados opuestos de la célula. La célula se divide entonces con un conjunto de cromosomas en cada una de las células hija. La colchicina suprime la división celular al inhibir la formación de los microtúbulos del husillo, lo que evita que la célula distribuya las dos copias de los cromosomas a lados opuestos de la célula. Entonces, la célula no se divide.

Diploide. Que tiene dos conjuntos o un par de cromosomas.

35 Plantas diploides. "Plantas diploides" significa plantas o trasplantes derivados de semillas diploides de plantación, o a partir de micropropagación.

Esencialmente todas las características fisiológicas y morfológicas. Una planta que tiene "esencialmente todas las características fisiológicas y morfológicas" significa una planta que tiene las características fisiológicas y morfológicas, excepto las características derivadas del gen convertido.

40 Tira explosivo. "La tira explosivo" en sandía es un rasgo en el que la piel es tierna y se abre con un estallido cuando se corta con un cuchillo. Está provocada por un gen denominado "e". La piel también puede explotar antes de que el fruto de la sandía alcance la madurez fisiológica, y da como resultado un fruto no comercializable.

Flores femeninas. "Flores femeninas" significa las flores imperfectas femeninas.

45 Firmeza del fruto. "Firmeza del fruto" significa la presión necesaria, en libras, para perforar la piel externa de la fruta usando un aparato medidor de la presión de la fruta (modelo FT327 con una punta de 8,0 mm de la International Ripening Company, Norfolk, Virginia).

Haploide. Que tiene el mismo número de conjuntos de cromosomas como una célula germinal, o tantas como la mitad de una célula somática.

50 Separación de la pulpa. "Separación de la pulpa" es la característica de separación de tejido en el endocarpio, que puede estar causada por un crecimiento rápido del fruto y un tejido débil. La presencia de la separación de la pulpa

(o una variante que es la desunión placentaria) está afectada por el entorno, pero también se puede seleccionar en el desarrollo de líneas endogámicas. No se comprende el control genético de este rasgo indeseable.

Hoja lobulada. "Hoja lobulada" significa una hoja que tiene dos o más lóbulos.

Flores masculinas. "Flores masculinas" significa las flores imperfectas masculinas.

5 Hoja no lobulada. "Hoja no lobulada" significa una hoja que no está lobulada.

Planta. "Planta" incluye células vegetales, protoplastos vegetales, células vegetales de cultivo tisular a partir de las cuales se pueden generar plantas de sandías, callos vegetales, aglomeraciones vegetales y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas tales como polen, flores, semillas, hojas, tallos, piel, pulpa y similar.

Diámetro de la planta. "Diámetro de la planta" significa la longitud media de las medidas de la planta, en pulgadas.

10 Ploidía. El número de conjuntos individuales de cromosomas en una célula u organismo.

Loci de rasgos cuantitativos (QTL). "Loci de rasgos cuantitativos (QTL)" se refiere a los loci genéticos que controlan en cierto grado los rasgos numéricamente representables que están distribuidos habitualmente de forma continua.

Regeneración. "Regeneración" se refiere al desarrollo de una planta a partir de cultivo tisular.

15 Patrón de piel. El "patrón de piel" es la coloración de la piel en sandías, que puede variar desde verde claro, a menudo denominado gris, a verde medio a verde muy oscuro, que parece casi negro. Además, la piel puede tener rayas de diversos diseños que son típicas de una variedad o tipo. Por lo tanto, las expresiones "raya de tigre", "raya moteada", "raya moteada negra", etc., se usan para identificar diversos patrones.

Ramificaciones secundarias. "Ramificaciones secundarias" significa las ramificaciones que resultan de la división de las ramas primarias (corona).

20 "Sin semillas". "Sin semillas" significa una sandía en la que el desarrollo del embrión se abortó y el proceso de desarrollo de las semillas se ha detenido antes de producir una semilla viable madura. El fruto sin semilla puede contener trazas de la semilla en desarrollo y ocasionalmente se puede formar un revestimiento de semilla y se puede hacer duro y tener el aspecto de una semilla.

25 Convertida de único gen (conversión). Planta "convertida de único gen" (o conversión) se refiere a plantas que se desarrollan mediante una técnica de reproducción vegetal denominada retrocruzamiento o vía ingeniería genética, en la que esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas deseadas de una línea endogámica se recuperan además del único gen transferido en la línea endogámica vía la técnica de retrocruzamiento o vía ingeniería genética.

Tetraploide. Que tiene cuatro veces el número haploide de cromosomas en el núcleo celular.

30 Piel gruesa. "Piel gruesa" se hereda de manera poligénica (controlada por más de un gen). La piel gruesa es proporcional al diámetro global del fruto (tamaño del fruto). Un grosor de la piel de 3/4" es aceptable para una sandía de 16 libras; pero para una sandía de 10 libras, la piel no debería tener más de 1/4" para que sea comercializable.

Plantas triploides. "Plantas triploides" significa plantas o transplantes derivados de semillas triploides en plantación o a partir de micropropagación.

35 Longitud de la enredadera. "Longitud de la enredadera" es la longitud de los patines (enredaderas), y se mide en pulgadas.

Rendimiento. "Rendimiento" significa el peso total, en libras, de un fruto de sandía cosechado por acre.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 La presente invención se refiere a un nuevo alelo, denominado "HMBN", en el género *Citrullus*, que se expresa fenotípicamente en una planta compacta de múltiples ramificaciones y pequeño fruto. La presente invención también se refiere a una semilla de sandía, a una planta de sandía y a partes vegetales, a una variedad de sandía y a un híbrido de sandía que comprende el nuevo alelo HMBN. La presente invención también se refiere a un método para producir las plantas y semillas de sandía descritas.

45 El porte vegetal de una sandía que tiene el alelo mutante tiene un incremento evidente en la ramificación secundaria en comparación con diploides normales y con líneas homocigotas que contienen los genes dw-2 o dw-1.

El alelo de la presente invención se transfiere fácilmente entre la variedad del cultivo depositada y las variedades de cultivo relacionadas. El alelo y los métodos de la presente invención se pueden usar para modificar y reducir el peso de los frutos y el porte de la planta de todas las variedades de cultivo de *C. lanatus* para la producción comercial. Generalmente, los métodos implican la emasculación de un progenitor, seguido de la aplicación de polen del otro

progenitor al estigma del primer progenitor. Los cruces se pueden realizar usando cualquier progenitor como el progenitor del polen.

Una planta de la presente invención se puede obtener cruzando una planta homocigota para el alelo mutante reivindicado con cualquier variedad de cultivo de sandía que carezca del alelo. La planta que contiene el alelo puede ser cualquier variedad de *C. lanatus*, incluyendo una variedad de cultivo en la que el factor se ha fijado previamente de forma genética.

Debido a que el alelo HMBN actúa como un único alelo recesivo, la generación F_1 no tendrá múltiples ramificaciones. Sólo una planta homocigota para el alelo mostrará completamente el fenotipo de múltiple ramificación. Este fenotipo se puede usar para identificar la progeñe que es homocigota para el alelo mutante reivindicado. Tras autofecundar la población F_1 , la generación F_2 mostrará el fenotipo en una relación de aproximadamente 1:3. El retrocruzamiento de individuos F_2 de múltiples ramificaciones con una planta progenitora normal recurrente producirá la población F_1 retrocruzada. La autofecundación de la población F_1 retrocruzada dará la generación F_2 retrocruzada. Al igual que en la población F_2 , el rasgo de múltiple ramificación se segregará en una relación de alrededor de 1:3 en esta población. Los retrocruzamientos repetidos producirán una variedad de cultivo de múltiples ramificación con las características de la variedad de cultivo progenitora recurrente. De este modo, el alelo HMBN se fijará genéticamente en la variedad de cultivo resultante. El rasgo se puede transmitir entonces mediante cruce sexual con otras variedades de cultivo, si se desea.

Para introducir el alelo HMBN en la variedad de cultivo deseado, se pueden usar otros esquemas de reproducción. El esquema particular usado no es crítico para la invención, en tanto que el alelo se incorpore de forma estable en el genoma de la variedad de cultivo. Por ejemplo, se puede usar un gen marcador. Para identificar las plantas deseadas en la generación F_1 , se puede usar una sonda de ácido nucleico que se hibrida al gen marcador.

A fin de determinar si una variedad de cultivo de múltiple ramificación desconocida posee el alelo HMBN reivindicado, se puede llevar a cabo un ensayo genético clásico para alelismo. La variedad de cultivo se cruza con una planta que se sabe que posee el alelo reivindicado. Analizando la generación F_1 resultante, se puede determinar el genotipo de la variedad de cultivo desconocida. Si la variedad de cultivo desconocida posee el alelo HMBN, se observará el fenotipo de múltiple ramificación en la generación F_1 .

El alelo HMBN se transfiere fácilmente de una variedad de cultivo a otra. La condición homocigota es bastante fácil de identificar. El homocigoto se puede identificar tempranamente, mucho antes de la floración.

El alelo HMBN se introducirá ventajosamente en variedades que contienen otros rasgos genéticos deseables, tales como resistencia a enfermedad, maduración temprana del fruto, tolerancia a la sequía, forma del fruto, capacidad para no formar semillas, y similares.

La sandía de la presente invención fue un alelo mutante inesperado que surgió de un proyecto de reproducción de sandía. En el proyecto de reproducción se usó una estirpe de reproducción de sandía, denominada estirpe 610f5, y contenía el alelo HMBN.

El mutante de sandía de la presente invención se cruzó en otras líneas de semillas y en líneas vegetativas. Se produjo una serie de plantas de sandía que expresan el rasgo mutante en la generación F_2 . Semillas propias de esta serie de plantas produjeron plantas que tenían todas múltiples ramificaciones.

La invención también se refiere a métodos para producir una planta de sandía que contiene en su material genético uno o más transgenes, y a la planta de sandía transgénica producida por ese método.

En otro aspecto, la presente invención proporciona plantas convertidas de un solo gen de HMBN. El único gen transferido puede ser preferiblemente un alelo dominante o recesivo. Preferiblemente, el gen transferido único conferirá un rasgo, tal como esterilidad masculina, resistencia a herbicidas, resistencia a insectos, resistencia a enfermedad bacteriana, fúngica o vírica, fertilidad masculina, madurez temprana, calidad nutricional mejorada, y sabor mejorado. El gen individual puede ser un gen de sandía de origen natural, o un transgén introducido mediante técnicas de ingeniería genética.

La invención se refiere además a métodos para desarrollar plantas de sandía en un programa de reproducción de plantas de sandía usando técnicas de reproducción vegetal que incluyen selección recurrente, retrocruzamiento, reproducción de pedigrí, selección potenciada por polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, selección potenciada por marcador genético y transformación. Las semillas, plantas de sandía, y sus partes, producidas por tales métodos de reproducción, también son parte de la invención.

La presente invención tiene un número medio de frutos mayor que 3,0, incluyendo un número de frutos en el intervalo de números enteros y sus partes, incluyendo 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, y 10,0.

Otro aspecto de la presente invención tiene un número medio de ramificaciones secundarias a 30 cm mayor que 20,0, incluyendo un número de ramificaciones secundarias a 30 cm mayor que 20,0 en el intervalo de números

enteros y sus partes, incluyendo 20,0, 21,0, 22,0, 23,0, 24,0, 25,0, 26,0, 27,0, 28,0, 29,0, 30,0, 31,0, 32,0, 33,0, 34,0, 35,0, 36,0, 37,0, 38,0, 39,0, 40,0, 41,0, 42,0, 43,0, 44,0, 45,0, 46,0, 47,0, y 48,0.

Otro aspecto de la presente invención tiene un número medio de ramificaciones secundarias a 90 cm mayor que 19,0, incluyendo un número de ramificaciones secundarias a 90 cm mayor que 19,0 en el intervalo de números enteros y sus partes, incluyendo 19,0, 20,0, 21,0, 22,0, 23,0, 24,0, 25,0, 26,0, 27,0, 28,0, 29,0, 30,0, 31,0, 32,0, 33,0, 34,0, 35,0, 36,0, 37,0, 38,0, 39,0, 40,0, 41,0, 42,0, 43,0, 44,0, 45,0, 46,0, 47,0, 48,0, 49,0, y 50,0.

Otro aspecto de la presente invención tiene un peso medio del fruto menor que 1,5 kilogramos, incluyendo un peso del fruto en el intervalo de números enteros y sus partes, incluyendo 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, y 0,3 kilogramos.

Otro aspecto de la presente invención tiene una firmeza media del fruto menor que 17,0 libras, incluyendo una firmeza del fruto en el intervalo de números enteros y sus partes, incluyendo 17,0, 16,0, 15,0, 14,0, 13,0, 12,0, 11,0, 10,0, 9,0, 8,0, 7,0, 6,0, 5,0, y 4,0 libras.

Otro aspecto de la presente invención tiene un número medio de flores masculinas mayor que 13,0 en el día 8, incluyendo un número medio de flores masculinas en el día 8 en el intervalo de números enteros y sus partes, incluyendo 13,0, 14,0, 15,0, 16,0, 17,0, 18,0, 19,0, 20,0, 21,0, 22,0, 23,0, 24,0, 25,0, 26,0, 27,0, 28,0, 29,0, 30,0, 31,0, 32,0, 33,0, 34,0, 35,0, 36,0, 37,0, 38,0, 39,0, y 40,0.

Otro aspecto de la presente invención tiene un número medio de flores masculinas mayor que 11,0 en el día 15, incluyendo un número medio de flores masculinas en el día 15 en el intervalo de números enteros y sus partes, incluyendo 11,0, 12,0, 13,0, 14,0, 15,0, 16,0, 17,0, 18,0, 19,0, 20,0, 21,0, 22,0, 23,0, 24,0, 25,0, 26,0, 27,0, 28,0, 29,0, y 30,0.

Otro aspecto de la presente invención tiene un número medio de flores masculinas mayor que 7,0 en el día 22, incluyendo un número medio de flores masculinas en el día 22 en el intervalo de números enteros y sus partes, incluyendo 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0, 12,0, 13,0, 14,0, 15,0, 16,0, 17,0, 18,0, 19,0, 20,0, y 21,0.

Esta presente invención se refiere al desarrollo de plantas únicas de la especie *Citrullus*. La planta de sandía de la presente invención expresa un incremento sustancial en la ramificación, que da como resultado una planta compacta. Un gen o alelo transferible, denominado HMBN, que transporta esta característica, se ha aislado e incorporado en otros transfondos genéticos. El alelo de la actual invención también se ha expresado en diferentes transfondos genéticos de sandía.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención, y no pretenden limitar la invención más allá de las limitaciones expuestas en las limitaciones anejas.

Ejemplo 1

El alelo HMBN de la presente invención incrementa enormemente el número de ramificaciones secundarias por planta. Las variedades diploides estándar ensayadas tenían de media 16 ramificaciones secundarias por planta; las enanas ensayadas oscilaron de 3 a 25 ramificaciones secundarias, con una media de 11,3 por planta. Las líneas de ramificación múltiple de la presente invención oscilaron de 32 a 72 ramificaciones secundarias por planta, con una media de 44,9. En la actual invención, las plantas son visiblemente más pequeñas que las variedades diploides estándar. La ramificación más larga media de la presente invención es 142,8 cm, en comparación con 226,7 cm de una variedad diploide estándar. Las seis líneas enanas ensayadas diferentes tuvieron de media 100,6 cm para la rama más larga, menor que tanto las líneas de ramificación múltiple de la presente invención como las diploides estándar. En la presente invención, las plantas también tienen internodos ostensiblemente más pequeños que las diploides estándar, pero no tan pequeños como las líneas enanas.

Como se muestra en la Tabla 1 más abajo, se compara una variedad que contiene el alelo HMBN de la presente invención, HMBN, con dos variedades enanas, J86 (dw-2) y Bush Jubilee (dw-1), y con una variedad diploide estándar, Allsweet.

TABLA 1

Carácter	Variedad			
	HMBN	J86	Bush Jubilee	Allsweet
Ramificación media más larga	142,8 cm	116 cm	120,7 cm	226,7 cm
Intervalo de ramificación más larga	101-177 cm	94-136 cm	111-126 cm	195-244 cm

Carácter	Variedad			
	HMBN	J86	Bush Jubilee	Allsweet
Ramificación media más corta	55,1 cm	54,3 cm	76,3 cm	124,0 cm
Intervalo de ramificación más corta	27-72 cm	44-71 cm	61-100 cm	105-135 cm
Nº medio de ramificaciones primarias	6,9	5,8	5,3	4,7
Intervalo de nº de ramificaciones primarias	5-10	5-7	5-6	4-5
Nº medio de ramificaciones secundarias a 30 cm	44,9	19,3	7,3	14,7
Intervalo de nº de ramificaciones secundarias a 30 cm	32-65	17-23	7-8	12-17
Nº medio de ramificaciones secundarias a 90 cm	49,3	18,3	6,3	14,7
Nº medio de ramificaciones secundarias a 90 cm	37-72	13-22	5-7	13-17
Longitud media de internodos	4,4 cm	3,4 cm	4,1 cm	7,2 cm
Intervalo de longitud de internodos	3-6 cm	2,2-4,6 cm	4-4,6 cm	5,4-9,8 cm

El alelo HMBN de la presente invención provoca un incremento muy visible en el número de flores por planta en comparación tanto con las líneas enanas ensayadas como con los estándar diploides. Este incremento en el número de flores se aplica tanto a las flores masculinas como femeninas, y es constante durante el período de floración.

- 5 En la Tabla 2 más abajo, se compara una variedad que contiene el alelo HMBN de la presente invención, HMBN, con dos variedades enanas, J86 y Bush Jubilee, y con una diploide estándar, Allsweet, para el número de flores por planta durante un período de floración de 22 días.

TABLA 2

Número medio de flores masculinas/femeninas por planta para cada variedad				
	HMBN	J86	Bush Jubilee	Allsweet
Flores masculinas día 1	7	3	1	3
Intervalo de flores masculinas día 1	1-16	2-6	0-2	1-3
Flores femeninas día 1	1	0	0	0
Intervalo de flores femeninas día 1	0-4	0	0	0-1
Flores masculinas día 8	27	12	6	5
Intervalo de flores masculinas día 8	4-53	8-15	3-11	3-7
Flores femeninas día 8	3	1	1	0
Intervalo de flores femeninas día 8	0-7	0-3	1-3	0
Flores masculinas día 15	19	10	8	3
Intervalo de flores masculinas día 15	5-38	5-13	6-9	3-4
Flores femeninas día 15	2	1	2	0
Intervalo de flores femeninas día 15	0-6	0-3	1-2	0
Flores masculinas día 22	13	7	4	1
Intervalo de flores masculinas día 22	0-21	1-16	4-5	0-1

Número medio de flores masculinas/femeninas por planta para cada variedad				
	HMBN	J86	Bush Jubilee	Allsweet
Flores femeninas día 22	1	0	1	0
Intervalo de flores femeninas día 22	0-4	0	0-2	0

El alelo HMBN de la presente invención también incrementa el número de fruto por planta en comparación con la enana ensayada y las variedades diploides estándar. Las líneas de ramificación múltiple de la presente invención tuvieron de media 9,1 frutos por planta, mientras que las líneas enanas tuvieron de media 1,8 frutos por planta, y la variedad diploide estándar tuvo de media 1,0 fruto por planta. El peso del fruto de las variedades que contienen el alelo HMBN de la presente invención también fue menor que el de las diploides estándar, 1,6 kg en comparación con 8,98 kg.

En la Tabla 3, se compara una variedad que contiene el alelo HMBN de la presente invención, HMBN, con dos variedades enanas, J86 y Bush Jubilee, y con una variedad diploide estándar, Allsweet, para las características de las hojas y de los frutos.

TABLA 3

Caracteres de hojas y frutos	Variedad			
	HMBN	J86	Bush Jubilee	Allsweet
Anchura media de hoja (cm)	8,7	8,8	9,8	11,3
Intervalo de anchura de hoja (cm)	6-12	7,5-9,5	11-16	10-14,5
Longitud media de hoja (cm)	10,0	13,0	18,3	19,7
Intervalo de longitud de hoja (cm)	7-14	10,5-21,5	13-20	16-22
Número medio de frutos	9,1	2,7	1,0	1,0
Intervalo de número de frutos	7-13	1-4	1	1
Peso medio de frutos (kg)	0,87	3,7	5,6	8,98
Intervalo de peso de frutos (kg)	0,72-1,01	2,9-4,6	4,8-6,3	7,37-11,13

Ejemplo 2

Las líneas HMBN y las dos líneas enanas, J86 y Bush Jubilee, se cruzaron para producir todas las posibles combinaciones F_1 . Todas las F_1 dieron como resultado tipos de enredaderas normales, indicando que los genes HMBN, dw-1 y dw-2 son genes recesivos únicos diferentes.

Ejemplo 3

En la Tabla 4, se autopolinizaron dos poblaciones F_1 diferentes de Normal/HMBN cada una para producir la progenie F_2 . La línea Normal fue HM17. Los resultados de los datos de segregación de F_2 se ajustan a la relación fenotípica 3:1 esperada, indicando que el alelo HMBN es un alelo recesivo único.

TABLA 4

Población F_2	Número total de plantas	Número de plantas normales	Número de plantas HMBN
Población nº 1	266	199	66
Población nº 2	247	184	60

Ejemplo 4

En la Tabla 5 más abajo, se autofecundó una población F₁ separada de HMBN/dw-1 para producir la progenie F₂. Los resultados de los datos de segregación de F₂ se ajustan a la relación fenotípica 9:3:3:1, indicando que los genes HMBN y dw-1 actúan como únicos genes recesivos en diferentes loci.

TABLA 5

Número de cada fenotipo – El número total de progenie consistió en 47 plantas			
27 Normal	13 dw-1	6 HMBN	2 dw-1/HMBN

5

Ejemplo 5

En la Tabla 6 a continuación, se autofecundó una población F₁ diferente de HMBN/dw-2 para producir la progenie F₂. Los resultados de los datos de segregación de F₂ se ajustan a la relación fenotípica 9:3:3:1, indicando que los genes HMBN y dw-2 actúan como únicos genes recesivos en diferentes loci.

10

TABLA 6

Número de cada fenotipo – El número total de progenie consistió en 79 plantas			
40 Normal	17 dw-2	16 HMBN	6 dw-2/HMBN

Ejemplo 6

En la Tabla 7 más abajo, se comparó la firmeza externa del fruto de genotipos HMBN que tienen el alelo HMBN con Sangría usando lecturas de penetrómetro en libras (tomadas con un medidor de presión de frutos, modelo FT327, y usando una punta de 8,0 mm). La lectura media del penetrómetro, en libras, para la variedad que contiene el alelo HMBN fue 6,93, mientras que la media para Sangría fue 17,27.

15

TABLA 7

Firmeza Externa del Fruto HMBN en comparación con Sangría								
Fruto n°	Penetrómetro	Peso (kg)	Fruto n°	Penetrómetro	Peso (kg)	Fruto n°	Penetrómetro	Peso (kg)
1	6,90	0,78	45	5,90	0,52	89	7,90	0,50
2	9,45	0,92	46	6,40	0,74	90	6,20	0,60
3	6,40	0,68	47	7,00	0,86	91	5,90	0,62
4	7,70	0,64	48	6,75	0,84	92	7,20	0,70
5	9,40	1,04	49	6,90	1,08	93	9,10	0,50
6	5,50	0,48	50	6,40	0,96	94	6,45	0,62
7	5,30	0,62	51	10,00	0,84	95	7,40	0,58
8	7,20	0,78	52	6,10	0,68	96	5,90	0,60
9	6,10	0,64	53	6,40	0,86	97	8,60	0,80
10	7,90	0,66	54	5,90	0,68	98	9,40	0,64
11	6,80	0,88	55	6,35	0,84	99	6,30	0,64
12	6,80	0,74	56	7,70	0,56	100	6,20	0,52
13	6,85	0,78	57	6,10	0,74	101	6,00	0,85
14	7,00	0,68	58	6,80	0,58	102	8,20	0,62
15	6,20	0,62	59	6,70	0,68	103	7,10	0,48

Firmeza Externa del Fruto HMBN en comparación con Sangria								
Fruto nº	Penetrómetro	Peso (kg)	Fruto nº	Penetrómetro	Peso (kg)	Fruto nº	Penetrómetro	Peso (kg)
16	6,40	0,68	60	6,65	0,74	104	9,10	0,80
17	7,00	0,70	61	9,60	0,80	105	6,10	0,76
18	7,80	0,56	62	6,80	0,84	106	5,60	0,62
19	7,70	0,66	63	6,00	0,76	107	5,35	0,48
20	5,10	0,78	64	7,00	0,72	108	9,00	0,70
21	6,30	0,60	65	6,20	0,58	109	8,70	0,74
22	6,50	0,68	66	7,30	0,94	110	6,10	0,78
23	9,50	0,44	67	6,50	0,72	111	7,00	0,64
24	6,50	0,88	68	6,80	0,54	112	6,65	0,58
25	7,20	1,22	69	7,40	0,76	113	7,30	0,66
26	7,00	0,74	70	6,70	0,68	114	7,00	0,66
27	6,60	0,72	71	5,60	0,86	115	8,50	0,64
28	5,90	0,66	72	5,45	0,80	116	8,00	0,66
29	5,10	0,80	73	7,30	0,70	117	6,40	0,82
30	6,85	0,76	74	7,10	0,68	118	8,20	0,72
31	4,50	0,82	75	7,70	0,78	119	7,20	0,46
32	6,90	0,64	76	10,50	0,72	120	5,40	0,64
33	5,70	0,80	77	7,30	0,76	121	6,60	0,72
34	7,00	0,98	78	7,00	0,80	122	6,90	0,93
35	5,90	0,74	79	4,90	0,62	123	6,30	0,70
36	7,70	0,68	80	6,55	0,72	124	6,15	0,60
37	4,40	0,66	81	8,50	0,84	125	9,70	0,66
38	6,20	0,82	82	6,90	0,70	Medio	6,93	0,71
39	6,10	0,82	83	7,30	0,62			
40	6,60	0,74	84	7,30	0,70	Sangria	13,20	6,84
41	7,75	0,76	85	5,10	0,54	Sangria	17,30	9,58
42	6,25	0,82	86	7,00	0,54	Sangria	21,30	8,68
43	7,10	0,82	87	5,20	0,58	Medio	17,27	8,37
44	10,70	0,76	88	7,40	0,54			

Esta invención también se refiere a la producción de una planta de sandía cruzando una primera planta de sandía progenitora con una segunda planta de sandía progenitora, en la que la primera o segunda planta de sandía progenitora contiene el alelo HMBN de la presente invención. Además, esta invención se refiere a la producción de una planta de sandía derivada de la línea de sandía endogámica HMBN cruzando una línea de sandía endogámica que contiene el alelo HMBN con una segunda planta de sandía y haciendo crecer la semilla de la progenie, y repitiendo las etapas de cruce y crecimiento con la planta derivada de la línea de sandía endogámica HMBN de 1, 2,

3, 4, 5, 6 a 7 veces. Se puede emplear cualquiera de tales métodos usando una línea de sandía que contiene el alelo HMBN: autofecundación, retrocruzamientos, producción de híbridos, cruces con poblaciones, y similares. Todas las plantas producidas usando una línea de sandía que contiene el alelo HMBN como progenitora están dentro del alcance de esta invención, incluyendo plantas derivadas de líneas de sandía endogámicas que tienen HMBN.

Se debería entender que la línea endogámica se podría producir, a través de manipulación habitual de factores citoplásmicos u otros factores, en forma estéril masculina. Tales realizaciones también se contemplan dentro del alcance de las presentes reivindicaciones.

Como se usa aquí, el término "planta" incluye células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos tisulares de células vegetales a partir de los cuales se pueden regenerar plantas de sandía, callos de plantas, racimos de plantas y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas, tales como embriones, polen, óvulos, flores, hojas, tallos, y similares.

Como es bien conocido en la técnica, el cultivo tisular de sandía se puede usar para la regeneración in vitro de plantas de sandía. Los cultivos tisulares de diversos tejidos de sandía, y la regeneración de plantas a partir de ellos, son bien conocidos y están publicados. A título de ejemplo, se ha usado un cultivo tisular que comprende órganos para producir plantas regeneradas, como se describe en *Regeneration and Micropropagation: Techniques, Systems and Media 1991-1995*, en Herman, E.B., ed., *Recent Advances in Plant Tissue Culture*, Volumen 3 (1995); Desamero et al., *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33:265-271 (1993); Tabei et al. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 10:235 (1993). De este modo, otro aspecto de esta invención es proporcionar células que, con el crecimiento y diferenciación, producen plantas de sandía que tienen las características fisiológicas y morfológicas de una línea de sandía que contiene el alelo HMBN.

Con el advenimiento de técnicas biológicas moleculares que permiten el aislamiento y caracterización de genes que codifican productos proteicos específicos, los científicos en el campo de la biología vegetal desarrollaron un fuerte interés en la manipulación mediante ingeniería del genoma de las plantas para que contuviesen y expresasen genes extraños, o versiones adicionales modificadas de genes nativos, o endógenos (quizás dirigidos por diferentes promotores), a fin de alterar los rasgos de una planta de manera específica. Tales genes extraños adicionales y/o modificados se denominan aquí colectivamente como "transgenes". A lo largo de los últimos cincuenta a veinte años se han desarrollado varios métodos para producir plantas transgénicas, y la presente invención, en realizaciones particulares, también se refiere a versiones transformadas de las plantas reivindicadas que tienen el alelo mutante.

La transformación vegetal implica la construcción de un vector de expresión que funcionará en células vegetales. Tal vector comprende ADN que comprende un gen bajo el control de, o enlazado operativamente a, un elemento regulador (por ejemplo un promotor). El vector de expresión puede contener una o más de tales combinaciones de gen enlazado operablemente/elemento regulador. El vector o vectores pueden estar en forma de un plásmido, y se pueden usar solos o en combinación con otros plásmidos, para proporcionar plantas de sandía transformadas, usando métodos de transformación como se describen más abajo para que incorporen genes en el material genético de la planta o plantas de sandía.

Vectores de expresión para la transformación de sandía

Genes marcadores – Los vectores de expresión incluyen al menos un marcador genético, operablemente enlazado a un elemento regulador (por ejemplo, un promotor) que permite que las células transformadas que contienen el marcador sean recuperadas mediante selección negativa, es decir, inhibiendo el crecimiento de células que no contienen el gen marcador seleccionable, o mediante selección positiva, es decir, seleccionando el producto codificado por el marcador genético. Muchos genes marcadores seleccionables habitualmente usados para la transformación vegetal son bien conocidos en las técnicas de transformación, e incluyen, por ejemplo, genes que codifican enzimas que destoxifican metabólicamente un agente químico selectivo que puede ser un antibiótico o un herbicida, o genes que codifican una diana alterada que es insensible al inhibidor. También se conocen en la técnica unos pocos métodos de selección positiva.

Un gen marcador seleccionable habitualmente usado para la transformación vegetal es el gen de neomicina fosfotransferasa II (nptII), aislado del transposón Tn5, que, cuando se coloca bajo el control de señales reguladoras vegetales, confiere resistencia a canamicina. Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:4803 (1983) Eck et al., *Plant Cell Report*, 14:5 299-304 (1995). Otro gen marcador seleccionable usado normalmente es el gen de higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia al antibiótico higromicina. Vanden Elzen et al., *Plant Mol. Biol.*, 5:299 (1985).

Los genes marcadores seleccionables adicionales de origen bacteriano que confieren resistencia a antibióticos incluyen gentamicina acetil transferasa, estreptomycin fosfotransferasa y aminoglucósido-3'-adenil transferasa, el determinante de la resistencia a bleomicina. Hayford et al., *Plant Physiol.* 86:1216 (1988), Jones et al., *Mol. Gen. Genet.* 210:86 (1987), Svab et al., *Plant Mol. Biol.* 14:197 (1990), Hille et al., *Plant Mol. Biol.* 7:171 (1986). Otros genes marcadores seleccionables confieren resistencia a herbicidas tales como glifosato, glufosinato o broxinilo.

Comai et al., *Nature* 317:741-744 (1985), Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* 2:603-618 (1990) y Stalker et al., *Science* 242:419-423 (1988).

Los genes marcadores seleccionables para la transformación vegetal que no son de origen bacteriano incluyen, por ejemplo, dihidrofolato reductasa de ratón, 5-enol-piruvil-chiquimato-3-fosfato sintasa vegetal, y acetolactato sintasa vegetal. Eichholtz et al., *Somatic Cell Mol. Genet.* 13:67 (1987), Shah et al., *Science* 233:478 (1986), Charest et al., *Plant Cell Rep.* 8:643 (1990).

Otra clase de genes marcadores para la transformación vegetal requiere la identificación de células vegetales presuntamente transformadas, en vez de la selección genética directa de células transformadas en busca de resistencia a una sustancia tóxica tal como un antibiótico. Estos genes son particularmente útiles para cuantificar o visualizar el patrón espacial de expresión de un gen en tejidos específicos, y se denominan frecuentemente como genes informadores debido a que se pueden fusionar a un gen o a una secuencia reguladora génica para la investigación de la expresión génica. Los genes usados habitualmente para identificar células presuntamente transformadas incluyen beta-glucuronidasa (GUS), alfa-galactosidasa, luciferasa y cloranfenicol acetiltransferasa. Jefferson, R.A., *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387 (1987), Teeri et al., *EMBO J.* 8:343 (1989), Koncz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:131 (1987), DeBlock et al., *EMBO J.* 3:1681 (1984), Charnig et al., *Plant Science Limerick*. 1994, 98:2, 175-183, Hu Wei et al., *In vitro Cellular y Developmental Biology Plant* 37:1 12-18 (2001), Agharbaoui et al., *Plant Cell Report* 15:1/2 102-105 (1995).

Existen métodos in vivo para visualizar la actividad de GUS que no requieren la destrucción del tejido vegetal. *Molecular Probes publication* 2908, *IMAGENE GREEN*, p. 1-4 (1993) y Naleway et al., *J. Cell Biol.* 115:151a (1991). Sin embargo, estos métodos in vivo para visualizar la actividad de GUS no han demostrado ser útiles para la recuperación de células transformadas debido a la baja sensibilidad, los elevados fondos fluorescentes y las limitaciones asociadas con el uso de genes de luciferasa como marcadores seleccionables.

Se ha utilizado un gen que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) como marcador para la expresión génica en células procariotas y eucariotas. Chalfie et al., *Science* 263:802 (1994). GFP y los mutantes de GFP se pueden usar como marcadores identificables.

Promotores – Los genes incluidos en vectores de expresión deben ser dirigidos por una secuencia nucleotídica que comprende un elemento regulador, por ejemplo un promotor. Varios tipos de promotores son ahora bien conocidos en las técnicas de transformación, como lo son otros elementos reguladores que se pueden usar solos o en combinación con promotores.

Como se usa aquí, “promotor” incluye la referencia a una región de ADN en dirección 5' desde el comienzo de la transcripción e implicada en el reconocimiento y unión de ARN polimerasa y otras proteínas para iniciar la transcripción. Un promotor vegetal es un promotor capaz de iniciar la transcripción en células vegetales. Los ejemplos de promotores bajo control de desarrollo incluyen promotores que inician preferentemente la transcripción en ciertos tejidos, tales como hojas, raíces, semillas, fibras, vasos xilemáticos, traqueidas, o esclerénquima. Tales promotores se denominan “preferidos de tejidos”. Los promotores que inician la transcripción solamente en cierto tejido se denominan “específicos de tejido”. Un promotor específico del “tipo celular” dirige principalmente la expresión en ciertos tipos celulares en uno o más órganos, por ejemplo células vasculares en raíces u hojas. Un promotor “inducible” es un promotor que está bajo control medioambiental. Los ejemplos de condiciones medioambientales que pueden efectuar la transcripción mediante promotores inducibles incluyen condiciones anaerobias o la presencia de luz. Los promotores específicos de tejidos, preferidos de tejidos, específicos del tipo celular, e inducibles, constituyen la clase de promotores “no constitutivos”. Un promotor “constitutivo” es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones medioambientales.

A. Promotores inducibles

Un promotor inducible está enlazado operablemente a un gen para la expresión en sandía. Opcionalmente, el promotor inducible está enlazado operablemente a una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia señal que está enlazada operablemente a un gen para la expresión en sandía. Con un promotor inducible, la velocidad de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor.

En la actual invención se puede usar cualquier promotor inducible. Véase Ward et al., *Plant Mol. Biol.* 22:361-366 (1993). Los promotores inducibles ejemplares incluyen, pero no se limitan a, aquel del sistema ACEI que responde a cobre (Meft et al., *PNAS* 90:4567-4571 (1993)); el gen *ln2* del maíz, que responde a protectores de herbicida de bencenosulfonamida (Hershey et al., *Mol. Gen. Genetics* 227:229-237 (1991) y Gatz et al., *Mol. Gen. Genetics* 243:32-38 (1994)) o el represor Tet de Tn10 (Gatz et al., *Mol. Gen. Genetics* 227:229-237 (1991)). Un promotor inducible particularmente preferido es un promotor que responde a un agente inductor al que no responden normalmente las plantas. Un promotor inducible ejemplar es el promotor inducible de un gen de hormona esteroidea, cuya actividad transcripcional es inducida por una hormona glucocorticosteroide (Schena et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:0421 (1991)).

B. Promotores constitutivos

Un promotor constitutivo está enlazado operablemente a un gen para la expresión en sandía, o el promotor constitutivo está enlazado operablemente a una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia señal que está enlazada operablemente a un gen para la expresión en sandía.

En la actual invención se pueden utilizar muchos promotores constitutivos diferentes. Los promotores constitutivos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los promotores de virus vegetales tales como el promotor 35S de CaMV (Odell et al., *Nature* 313:810-812 (1985), Tababeizadeh et al., *Plant Cell Report* 19:2 197-202 (1999), Kunik et al., *Acta Horticulturae* 447, 387-391 (1997)) y los promotores procedentes de genes tales como la actina de arroz (McElroy et al., *Plant Cell* 2:163-171 (1990)); ubiquitina (Christensen et al., *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 (1989) y Christensen et al., *Plant Mol. Biol.* 18:675-689 (1992)); pEMU (Last et al., *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588 (1991)); MAS (Velten et al., *EMBO J.* 3:2723-2730 (1984)) y H3 histona de maíz (Lepetit et al., *Mol. Gen. Genetics* 231:276-285 (1992) y Atanassova et al., *Plant Journal* 2 (3): 291-300 (1992)).

El promotor ALS, fragmento de Xba1/NcoI, 5' con respecto al gen estructural ALS3 de *Brassica napus* (o una secuencia nucleotídica similar a dicho fragmento de Xba1/NcoI), representa un promotor constitutivo particularmente útil. Véase la solicitud PCT WO 96/30530.

C. Promotores específicos de tejidos o preferidos de tejidos

Un promotor específico de tejidos está enlazado operablemente a un gen para la expresión en sandía. Opcionalmente, el promotor específico de tejidos está enlazado operablemente a una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia señal que está enlazada operablemente a un gen para la expresión en sandía. Las plantas transformadas con un gen de interés enlazado operablemente a un promotor específico de tejidos producen el producto proteico del transgén exclusivamente, o preferentemente, en un tejido específico.

En la presente invención se puede utilizar cualquier promotor específico de tejidos o preferido de tejidos. Los promotores ejemplares específicos de tejidos o preferidos de tejidos incluyen, pero no se limitan a, promotores preferidos de raíces, tales como aquel del gen de faseolina (Murai et al., *Science* 23:476-482 (1983) y Sengupta-Gopalan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3320-3324 (1985)), tal como el promotor rolD de *Agrobacterium rhizogenes* como se menciona en Grichko et al., *Plant Physiology and Biochemistry* 39:1 19-25 (2001); un promotor específico de hojas e inducido por la luz tal como aquel de cab o rubisco (Simpson et al., *EMBO J.* 4(11):2723-2729 (1985) y Timko et al., *Nature* 318:579-582 (1985)); un promotor específico de anteras, tal como aquel de LAT52 (Twell et al., *Mol. Gen. Genetics* 217:240-245 (1989)); un promotor específico del polen, tal como aquel de Zm13 (Guerrero et al., *Mol. Gen. Genetics* 244:161-168 (1993)) o un promotor preferido de microesporas, tal como aquel de apg (Twell et al., *Sex. Plant Reprod.* 6:217-224 (1993)).

Secuencias señal para dirigir proteínas a compartimentos subcelulares

El transporte de proteína producida por transgenes a un compartimento subcelular tal como el cloroplasto, vacuola, peroxisoma, glioxisoma, pared celular o mitocondria, o para la secreción en el apoplasto, se logra enlazando operablemente la secuencia nucleotídica que codifica una secuencia señal a la región 5' y/o 3' de un gen que codifica la proteína de interés. Las secuencias seleccionadoras de dianas en el extremo 5' y/o 3' del gen estructural pueden determinar, durante la síntesis y el procesamiento de la proteína, dónde se compartimentaliza finalmente la proteína codificada.

La presencia de una secuencia señal dirige un polipéptido a un orgánulo intracelular o compartimento subcelular, o para la secreción al apoplasto. En la técnica se conocen muchas secuencias señal. Véanse, por ejemplo, Becker et al., *Plant Mol. Biol.* 20:49 (1992); Close, P.S., Master's Thesis, Iowa State University (1993); Knox, C., et al., *Plant Mol. Biol.* 9:3-17 (1987); Lerner et al., *Plant Physiol.* 91:124-129 (1989); Fontes et al., *Plant Cell* 3:483-496 (1991); Matsuoka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:834 (1991); Gould et al., *J. Cell. Biol.* 108:1657 (1989); Creissen et al., *Plant J.* 2:129 (1991); Kalderon, et al., *Cell* 39:499-509 (1984); Steifel, et al., *Plant Cell* 2:785-793 (1990).

Genes proteicos extraños y genes agronómicos

Con plantas transgénicas según la presente invención, se puede producir una proteína extraña en cantidades comerciales. De este modo, las técnicas para la selección y propagación de plantas transformadas, que son bien entendidas en la técnica, producen una pluralidad de plantas transgénicas que se recolectan de manera convencional, y entonces se puede extraer una proteína extraña de un tejido de interés o de la biomasa total. La extracción de la proteína a partir de la biomasa vegetal se puede lograr por métodos conocidos, que se explican, por ejemplo, por Heney y Orr, *Anal. Biochem.* 114:92-6(1981).

Según una realización preferida, la planta transgénica proporcionada para la producción comercial de proteína extraña es sandía. En otra realización preferida, la biomasa de interés es semilla. Para el número relativamente pequeño de plantas transgénicas que muestran mayores niveles de expresión, se puede generar un mapa genético, principalmente vía análisis convencional de RFLP, PCR y SSR, que identifica la localización cromosómica aproximada de la molécula de ADN integrada. Para metodologías ejemplares, véase a este respecto Glick y Thompson, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* CRC Press, Boca Raton 269:284 (1993). La información cartográfica con respecto a la localización cromosómica es útil para la protección en forma de patente

de una planta transgénica objeto. Si se lleva a cabo una propagación no autorizada y se realizan cruces con otro germoplasma, se puede comparar el mapa de la región de integración con mapas similares para plantas sospechosas, para determinar si estas últimas tienen un origen común con la planta objeto. Las comparaciones cartográficas implicarían hibridaciones, RFLP, PCR, SSR y secuenciación, todas las cuales son técnicas convencionales.

Igualmente, por medio de la presente invención, se pueden expresar genes agronómicos en plantas transformadas. Más particularmente, las plantas se pueden manipular mediante ingeniería genética para expresar diversos fenotipos de interés agronómico. Los genes ejemplares implicados a este respecto incluyen, pero no se limitan a, aquellos categorizados a continuación:

1. Genes que confieren resistencia a plagas o enfermedad, y que codifican:

A. Genes de resistencia a enfermedades de plantas. Las defensas de las plantas se activan a menudo mediante interacción específica entre el producto de un gen de resistencia a enfermedades (R) en la planta y el producto de un gen de avirulencia (Avr) correspondiente en el patógeno. Un alelo mutante vegetal se puede transformar con un gen o genes de resistencia clonados para manipular plantas que son resistentes a cepas específicas de patógenos. Véanse, por ejemplo Jones et al., *Science* 266:789 (1994) (clonación del gen Cf-9 del tomate para resistencia a *Cladosporium fulvum*); Martin et al., *Science* 262:1432 (1993) (gen Pto del tomate para resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. tomato que codifica una proteína cinasa); Mindrinos et al., *Cell* 78:1089 (1994) (gen RSP2 de *Arabidopsis* para resistencia a *Pseudomonas syringae*).

B. Una proteína de *Bacillus thuringiensis*, un derivado de la misma, o un polipéptido sintético modelado en ella. Véase, por ejemplo, Geiser et al., *Gene* 48:109 (1986), que describe la clonación y la secuencia nucleotídica de un gen de Bt- δ -endotoxina. Además, las moléculas de ADN que codifican genes de δ -endotoxina se pueden adquirir de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, por ejemplo, con los números de acceso ATCC 40098, 67136, 31995 y 31998. Véase también Mandaok et al., *Crop Protection*. 2000, 19: 5, 307-312.

C. Una lectina. Véase, por ejemplo, la descripción de Van Damme et al., *Plant Molec. Biol.* 24:25 (1994), que describe las secuencias nucleotídicas de varios genes de lectina que se unen a manosa de *Clivia miniata*.

D. Genes que codifican las proteínas de cubierta del virus del mosaico del pepino (CMV), véase Tomassoli et al., *Molecular Breeding*, 1999, 5: 2, 121-130, que confiere resistencia a CMV.

E. Un inhibidor enzimático, por ejemplo un inhibidor de proteasa o proteinasa o un inhibidor de amilasa o una proteína inhibidora de poligalacturonasa. Véanse, por ejemplo, Abe et al., *J. Biol. Chem.* 262:16793 (1987) (secuencia nucleotídica del inhibidor de cisteína proteinasa del arroz), Huub et al., *Plant Molec. Biol.* 21:985 (1993) (secuencia nucleotídica de ADNc que codifica el inhibidor I de proteinasa del tabaco), Sumitani et al., *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:1243 (1993) (secuencia nucleotídica de inhibidor de α -amilasa de *Streptomyces nitrosporeus*) y Powell et al., *Molecular Plant Microbe Interaction*, 2000, 13: 9 942-950 (tomates transformados con proteína inhibidora de poligalacturonasa de la fruta de la pera para inhibir endopoligalacturonasa patógena fúngica).

F. Una hormona o feromona específica de insectos, tal como un ecdisteroide u hormona juvenil, una variante de la misma, un mimético a base de la misma, o un antagonista o agonista de la misma. Véase, por ejemplo, la descripción de Hammock et al., *Nature* 344:458 (1990), de la expresión en baculovirus de la hormona juvenil clonada esterasa, un inactivador de la hormona juvenil.

G. Un péptido o neuropéptido específico de insectos que, con la expresión, interrumpe la fisiología de la plaga afectada. Por ejemplo, véanse las descripciones de Regan, *J. Biol. Chem.* 269:9 (1994) (la clonación de la expresión produce ADN que codifica el receptor de la hormona diurética de insectos), y Pratt et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163:1243 (1989) (una alostatina identificada en *Diploptera punctata*). Véase también la patente U.S. nº 5.266.317 de Tomalski et al., que describe genes que codifican neurotoxinas paralizantes específicas de insectos.

H. Un veneno específico de insectos producido en la naturaleza por una serpiente, una avispa, etc. Por ejemplo, véase Pang et al., *Gene* 116:165 (1992), para la descripción de la expresión heteróloga en plantas de un gen que codifica un péptido insectotóxico de escorpión.

I. Una enzima responsable de una hiperacumulación de un monoterpeno, un sesquiterpeno, un esteroide, un ácido hidroxámico, un derivado fenilpropanoide, u otra molécula no proteica con actividad insecticida.

J. Una enzima implicada en la modificación, incluyendo la modificación post-traducciona, de una molécula biológicamente activa; por ejemplo, una enzima glucolítica, una enzima proteolítica, una enzima lipolítica, una nucleasa, una ciclasa, una transaminasa, una esterasa, una hidrolasa, una fosfatasa, una cinasa, una fosforilasa, una polimerasa, una elastasa, una quitinasa y una glucanasa, ya sea natural o sintética. Véase la solicitud PCT WO 93/02197 a nombre de Scott et al., que describe la secuencia nucleotídica de un gen de callasa. Las moléculas de ADN que contienen secuencias que codifican quitinasas se pueden obtener, por ejemplo, a partir de la ATCC los números de acceso 39637 y 67152. Véase también Kramer et al., *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23:691 (1993), que

muestra la secuencia nucleotídica de un ADNc que codifica quitinasa del gusano del tabaco, y Kawalleck et al., Plant Molec. Biol. 21:673 (1993), que proporciona la secuencia nucleotídica del gen de poliubiquitina ubi4-2 del perejil.

K. Una molécula que estimula la transducción de señales. Por ejemplo, véase la descripción de Botella et al., Plant Molec. Biol. 24:757 (1994), de secuencias nucleotídicas para clones de ADNc de calmodulina de haba mungo, y Griess et al., Plant Physiol. 104:1467 (1994), que proporciona la secuencia nucleotídica de un clon de ADNc de calmodulina del maíz.

L. Un péptido de momento hidrofóbico. Véase la solicitud PCT WO 95/16776 (cuya descripción de los derivados peptídicos de taquiplensina inhibe patógenos vegetales fúngicos) y la solicitud PCT WO 95/18855 (que muestra péptidos antimicrobianos sintéticos que confieren resistencia a enfermedades).

M. Una permeasa de membrana, un formador de canal o un bloqueador de canal. Por ejemplo, véase la descripción de Jaynes et al., Plant Sci 89:43 (1993), de la expresión heteróloga de un análogo peptídico lítico de cecropina- β para hacer a plantas de tabaco transgénicas resistentes a *Pseudomonas solanacearum*.

N. Una proteína invasiva viral o una toxina compleja derivada de ella. Por ejemplo, la acumulación de proteínas de cubierta víricas en células vegetales transformadas proporciona resistencia a la infección vírica y/o al desarrollo de enfermedades efectuado por el virus del que deriva el gen de la proteína de cubierta, así como por virus relacionados. Véase Beachy et al., Ann. Rev. Phytopathol. 28:451 (1990). Se ha conferido resistencia mediada por la proteína de cubierta a plantas transformadas contra el virus del mosaico de la alfalfa, el virus del mosaico del pepino, el virus de las rayas del tabaco, el virus X de la patata, el virus Y de la patata, el virus del grabado del tabaco, el virus del cascabeleo del tabaco y el virus del mosaico del tabaco.

O. Un anticuerpo específico de insectos o una inmunotoxina derivada del mismo. De este modo, un anticuerpo dirigido contra una función metabólica crítica en el intestino del insecto inactivaría una enzima afectada, matando al insecto. Véase Taylor et al., Resumen #497, Seventh Int'l Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions (Edimburgo, Escocia) (1994) (inactivación enzimática en tabaco transgénico vía la producción de fragmentos de anticuerpos monocatenarios).

P. Un anticuerpo específico de virus. Véase, por ejemplo, Tavladoraki et al., Nature 366:469 (1993), que muestra que plantas transgénicas que expresan genes de anticuerpos recombinantes están protegidas del ataque de virus.

Q. Una proteína que detiene el desarrollo, producida en la naturaleza por un patógeno o un parásito. De este modo, las endo- α -1,4-D-poligalacturonasas fúngicas facilitan la colonización fúngica y la liberación de nutrientes vegetales al solubilizar homo- α -1,4-D-galacturonasa de la pared celular de la planta. Véase Lamb et al., Bio/Technology 10:1436 (1992). La clonación y caracterización de un gen que codifica una proteína inhibidora de endopoligalacturonasa de haba se describe por Toubart et al., Plant J. 2:367 (1992).

R. Una proteína que detiene el desarrollo producida en la naturaleza por una planta. Por ejemplo, Logemann et al., Biol/Technology 10:305 (1992), ha mostrado que plantas transgénicas que expresan el gen inactivador del ribosoma de cebada tienen una mayor resistencia a enfermedad fúngica.

2. Genes que confieren resistencia a un herbicida, por ejemplo:

A. Un herbicida que inhibe el punto de crecimiento o meristemo, tal como una imidazolinona o una sulfonilurea. Los genes ejemplares en esta categoría codifican la enzima mutante ALS y AHAS, como se describe, por ejemplo, por Lee et al., EMBO J. 7:1241 (1988), y Miki et al., Theor. Appl. Genet. 80:449 (1990), respectivamente.

B. Glifosato (resistencia alterada por 5-enol-piruvilchiquimato-3-fosfato sintasa (EPSP) mutante y genes *aroA*, respectivamente) y otros fosfonocompuestos tales como glufosinato (genes de fosfinotricin acetil transferasa (PAT) y PAT de *Streptomyces hygroscopicus*, bar), y ácidos piridinoxi o fenoxi propiónicos y ciclohexonas (genes que codifican inhibidores de ACCasa). Por ejemplo, véase la patente U.S. nº 4.940.835 de Shah, et al., que describe la secuencia nucleotídica de una forma de EPSP que puede conferir resistencia a glifosato. Una molécula de ADN que codifica un gen *aroA* mutante se puede obtener con el número de acceso ATCC 39256, y la secuencia nucleotídica del gen mutante se describe en la patente U.S. nº 4.769.061 de Comai. La solicitud de patente europea nº 0.333.033 de Kumada et al., y la patente U.S. nº 4.975.374 de Goodman et al., describen secuencias nucleotídicas de genes de glutamina sintetasa que confieren resistencia a herbicidas tales como L-fosfinotricina. La secuencia nucleotídica de un gen PAT se proporciona en la solicitud europea nº 0.242.246 de Leemans et al. DeGreef et al., Bio/Technology 7:61 (1989), describe la producción de plantas transgénicas que expresan genes bar quiméricos que codifican la actividad de PAT. Son ejemplos de genes que confieren resistencia a ácidos fenoxi propiónicos y a ciclohexonas, tales como sethoxydim y haloxyfop, los genes Acc1-S1, Acc1-S2 y Acc1-S3 descritos por Marshall et al., Theor. Appl. Genet 83:435 (1992).

C. Un herbicida que inhibe la fotosíntesis, tal como una triazina (genes *psbA* y *gs+*) o un benzonitrilo (gen de nitrilasa). Przibilla et al., Plant Cell 3:169 (1991), describe la transformación de *Chlamydomonas* con plásmidos que codifican genes *psbA* mutantes. Las secuencias nucleotídicas para genes de nitrilasa están descritas en la patente U.S. nº 4.810.648 de Stalker, y las moléculas de ADN que contienen estos genes están disponibles con los números

de acceso ATCC 53435, 67441, y 67442. La clonación y expresión de ADN que codifica una glutatona S-transferasa se describe por Hayes et al., Biochem. J. 285:173 (1992).

3. Genes que confieren o contribuyen a un rasgo de valor añadido, tales como:

- 5 A. Mayor tolerancia a la inundación, por ejemplo transformando una planta con una enzima bacteriana ÁCIDO desaminasa. Véase Grichko et al., Plant Physiology y Biochemistry, 2001, 39: 1, 19-25.
- B. Viscosidad mejorada del zumo y de la pulpa, transformando la planta con un gen antisentido de poligalacturonasa. Por ejemplo, véanse Porretta et al., Food Chemistry, 62:283-290 (1998) o Errington et al., Journal of the Science of Food y Agriculture, 76:515-519 (1998).
- 10 C. Producción reducida de polietileno a fin de controlar mejor la modulación del fruto al transformar la planta con una S-adenosilmetionina hidrolasa. Véase Good et al., Plant Molecular Biology, 1994, 26: 3, 781-790.
- D. Obtención de plantas estériles masculinas, especialmente útiles en la producción de sandías híbridas, mediante introducción de un gen que codifica una PR glucanasa del tabaco, como se describe en el documento WO 9738116.

Métodos para la transformación de sandías

- 15 Se han desarrollado numerosos métodos para la transformación vegetal, incluyendo protocolos de transformación vegetal biológicos y físicos. Véase, por ejemplo, Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" en Methods in Plant Molecular Biology y Biotechnology, Glick B.R. and Thompson, J. E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993) páginas 67-88. Además, existen vectores de expresión y métodos de cultivo in vitro para la transformación de células o tejidos vegetales y la regeneración de plantas. Véase, por ejemplo, Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" en Methods in Plant Molecular Biology y Biotechnology, Glick B.R. and Thompson, J. E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993) páginas 89-119.
- 20

A. Transformación mediada por *Agrobacterium*

- 25 Un método para introducir un vector de expresión en plantas se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium*. Véanse, por ejemplo, Frary et al., Plant Cell Report. 1996, 16: 3/4, 235-240, Roehel et al., Plant Cell Report. 1993, 12:11, 644-647, Hu-Wei et al., In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 2001 37:1, 12-18. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo patógenas para las plantas, que transforman genéticamente células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta. Véase, por ejemplo, Kado, C. I., Crit. Rev. Plant Sci. 10:1 (1991). Las descripciones de sistemas de vectores de *Agrobacterium*, y los métodos para la transferencia génica mediada por *Agrobacterium*, se proporcionan por Gruber et al., más arriba, Miki et al., más arriba, y Moloney et al., Plant Cell Reports 8:238 (1989). También véase la patente, U.S. nº 6.198.022 presentada el 6 de marzo de 2001.
- 30

B. Transferencia génica directa

- 35 A pesar del hecho de que el intervalo de hospedantes para la transformación mediada por *Agrobacterium* es amplio, algunas especies de cosechas de cereales principales y especies vegetales y gimnospermas han sido generalmente recalcitrantes a este modo de transferencia génica, incluso aunque se ha logrado recientemente cierto éxito en arroz y maíz. Hiei et al., The Plant Journal 6:271-282 (1994) y patente U.S. nº 5.591.616, presentada el 7 de enero de 1997. Se han desarrollado varios métodos de transformación vegetal, denominada colectivamente como transferencia génica directa, como alternativa a la transformación mediada por *Agrobacterium*.

- 40 Un método generalmente aplicable de transformación vegetal es la transformación mediada por microproyectiles, en la que se porta ADN en la superficie de microproyectiles que miden 1 a 4 µm. El vector de expresión se introduce en tejidos vegetales con un dispositivo biolístico que acelera los microproyectiles a velocidades de 300 a 600 m/s, que es suficiente para penetrar las paredes y membranas de la célula vegetal. Sanford et al., Part. Sci. Technol. 5:27 (1987), Sanford, J.C., Trends Biotech. 6:299 (1988), Klein et al., Bio/Technology 6:559-563 (1988), Sanford, J.C., Physiol Plant 7:206 (1990), Klein et al., Biotechnology 10:268 (1992), Baum et al., Plant Journal. 1997, 12: 2, 463-469, Eck et al., Plant Cell Report. 1995, 14: 5, 299-304, Manzara et al., Plant Molecular Biology Reporter 123: 221-226 (1994).
- 45

- Otro método para el suministro físico de ADN a las plantas es el tratamiento con ultrasonidos de células diana. Zhang et al., Bio/Technology 9:996 (1991). Como alternativa, para introducir vectores de expresión en plantas, se ha usado la fusión con liposomas y esferoplastos. Deshayes et al., EMBO J., 4:2731 (1985), Christou et al., Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:3962 (1987). También se ha dado a conocer la captación directa de ADN en protoplastos usando precipitación con CaCl₂, polialcohol vinílico o poli-L-ornitina. Hain et al., Mol. Gen. Genet. 199:161 (1985) y Draper et al., Plant Cell Physiol. 23:451 (1982). También se ha descrito la electroporación de protoplastos y células completas y tejidos. Donn et al., en Abstracts of VIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC, A2-38, p 53 (1990), D'Halluin et al., Plant Cell 4:1495-1505 (1992) y Spencer et al., Plant Mol. Biol. 24:51-61 (1994). Se ha dado a conocer una transferencia de cromosomas desde una línea donante transformada de patata a una
- 50

línea receptora de tomate mediante fusión inducida por PEG de microprotoplastos. Véase Ramalu et al., *Theoretical and Applied Genetics* 92:316-325 (1996).

Tras la transformación de tejidos diana de sandía, la expresión de los genes marcadores seleccionables descritos anteriormente permite la selección preferente de células transformadas, tejidos y/o plantas, usando métodos de regeneración y selección ahora bien conocidos en la técnica.

Los métodos anteriores para la transformación se usarían típicamente para producir una planta transgénica. La planta transgénica se podría cruzar entonces con otra planta (no transformada o transformada) a fin de producir una nueva planta transgénica. Como alternativa, un rasgo genético que se ha manipulado mediante ingeniería en una línea de sandía particular usando las técnicas de transformación anteriores se podría mover a otra línea usando técnicas de retrocruzamiento tradicionales que son bien conocidas en las técnicas de reproducción vegetal. Por ejemplo, se podría usar un enfoque de retrocruzamiento para mover un rasgo manipulado mediante ingeniería desde una variedad pública, no elitista, a una variedad elitista, o desde una variedad que contiene un gen extraño en su genoma a una línea que no contiene ese gen. Como se usa aquí, "cruzar" se puede referir a un cruce simple de X por Y, o el proceso de retrocruzamiento, dependiendo del contexto.

Cuando se usa la expresión planta de sandía endogámica en el contexto de la presente invención, esto también incluye cualesquiera conversiones del gen único de esa línea endogámica. La expresión planta convertida por gen único, como se usa aquí, se refiere a aquellas plantas de sandía que se desarrollan mediante una técnica de reproducción vegetal denominada retrocruzamiento, en la que esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas deseadas de una línea endogámica se recuperan, además del único gen transferido a la línea endogámica vía la técnica de retrocruzamiento. Se pueden usar métodos de retrocruzamiento con la presente invención para mejorar o introducir una característica en la línea endogámica. El término retrocruzamiento, como se usa aquí, se refiere al cruce repetido de una progenie híbrida nuevamente a una de las plantas de sandía progenitoras para esa línea endogámica. La planta de sandía progenitora que contribuye con el gen para la característica deseada se denomina el progenitor no recurrente o donante. Esta terminología se refiere al hecho de que el progenitor no recurrente se usa una vez en el protocolo de retrocruzamiento, y por lo tanto no vuelve a repetirse. La planta de sandía progenitora a la que se transfiere el gen o genes desde el progenitor no recurrente es conocida como el progenitor recurrente, ya que se usa para varias rondas en el protocolo de retrocruzamiento (Poehlman y Sleper, 1994; Fehr, 1987). En un protocolo de retrocruzamiento típico, la línea endogámica original de interés (progenitor recurrente) se cruza con una segunda línea endogámica (progenitor no recurrente) que posee el único gen de interés a transferir. La progenie resultante de este cruce se cruza entonces nuevamente con el progenitor recurrente, y el proceso se repite hasta que se obtiene una planta de sandía en la que esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas deseadas del progenitor recurrente se recuperan en la planta convertida, además del único gen transferido desde el progenitor no recurrente.

La selección de un progenitor recurrente adecuado es una etapa importante para un procedimiento de retrocruzamiento con éxito. La meta de un protocolo de retrocruzamiento es alterar o sustituir un único rasgo o característica en la línea endogámica original. Para lograr esto, un único gen de la línea endogámica recurrente se modifica o sustituye por el gen deseado del progenitor no recurrente, a la vez que retiene esencialmente el resto de la constitución genética deseada, y por tanto de la constitución fisiológica y morfológica deseada, de la línea endogámica original. La elección del progenitor no recurrente particular dependerá del fin del retrocruzamiento; uno de los fines principales es añadir algún rasgo comercialmente deseable y/o agrónomicamente importante a la planta. El protocolo de retrocruzamiento exacto dependerá de la característica o rasgo que se vea alterado para determinar un protocolo de ensayo apropiado. Aunque los métodos de retrocruzamiento se simplifican cuando la característica que se transfiere es un alelo dominante, también se puede transferir un alelo recesivo. En este caso, puede ser necesario introducir un ensayo de la progenie para determinar si la característica deseada se ha transferido con éxito.

Se han identificado muchos rasgos de gen único que no se seleccionan normalmente en el desarrollo de una nueva línea endogámica pero que se pueden mejorar mediante técnicas de retrocruzamiento. Los rasgos de gen único pueden ser o no transgénicos; los ejemplos de estos rasgos incluyen, pero no se limitan a, esterilidad masculina, tal como el gen de PRINCIPAL glucanasa, resistencia a herbicidas, tal como los genes *pat* o *bar*, resistencia a enfermedad bacteriana, fúngica (tal como los genes usados para resistencia a *Fusarium oxysporum*), o vírica (tal como los genes TM1 y TM2 usados para resistencia a TMV), resistencia a insectos, tal como los genes *Cry1Ac* o *Mi*, fertilidad masculina, calidad nutricional mejorada, contenido mejorado de azúcar, conservación mejorada y retraso de la maduración, tal como en el uso de los genes *nor* o *rin*, estabilidad del rendimiento y potenciación del rendimiento. Estos genes se heredan generalmente a través del núcleo. Algunos otros genes de esterilidad masculina conocidos se heredan citoplásmicamente, pero todavía actúan como rasgos de gen único. Varios de estos rasgos de gen único se describen en las patentes U.S. n°s 5.777.196; 5.948.957 y 5.969.212.

INFORMACIÓN DE DEPÓSITO

Las semillas de sandía que contienen el alelo mutante HMBN se han depositado en la Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 el 12 de noviembre de 2004, y tienen el número de acceso de depósito PTA-6300.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle por medio de ilustración y ejemplo con fines de claridad y comprensión. Sin embargo, será obvio que se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones, tal como modificaciones del gen único y variantes somaclonales, individuos variantes seleccionados de grandes poblaciones de las plantas, y similares, dentro del alcance de la invención, ya que está limitada solamente por el alcance de las reivindicaciones anejas.

5

REIVINDICACIONES

1. Una planta o semilla de sandía que contiene un alelo denominado HMBN que, cuando está presente en forma homocigota, confiere un fenotipo de ramificación múltiple que comprende un número medio de ramificaciones secundarias a 30 cm mayor que 20,0 y un peso medio de fruto menor que 1,5 kg, siendo dicha planta obtenible mediante un método que comprende cruzar una primera planta de sandía progenitora que contiene dicho alelo HMBN con una segunda planta de sandía progenitora; en el que una muestra representativa de semillas que contienen dicho alelo HMBN se depositó con el número de acceso ATCC PTA-6300.
2. Una planta o semilla de sandía de la reivindicación 1, que contiene un único alelo HMBN recesivo.
3. Una planta o semilla de sandía de la reivindicación 1, que es homocigota para dicho alelo HMBN.
4. Una planta de sandía de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es triploide y contiene dicho alelo HMBN.
5. Polen o un óvulo de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que contiene dicho alelo HMBN.
6. Un cultivo tisular de células de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células del cultivo tisular proceden de una parte vegetal seleccionada de embriones, células meristemáticas, callo, polen, hojas, anteras, tallos, pecíolos, raíces, puntas de raíces, frutos, semillas, flores, cotiledones, e hipocotilos, conteniendo dichas células de dicho cultivo tisular dicho alelo HMBN.
7. Un protoplasto de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o del cultivo tisular de la reivindicación 6, conteniendo dicho protoplasto dicho alelo HMBN.
8. Método para producir una planta de sandía que tiene todas las características morfológicas y fisiológicas de una planta de sandía que contiene el alelo HMBN mediante la regeneración de dicha planta a partir del cultivo tisular de la reivindicación 6.
9. Una planta de sandía de la reivindicación 3 ó 4, que contiene dicho alelo HMBN y que tiene:
 - (a) un número medio de frutos mayor que 3,0;
 - (b) un número medio de ramificaciones secundarias a 90 cm de más de 19,0;
 - (c) una firmeza media del fruto de menos de 17,0 libras;
 - (d) un número medio de flores masculinas mayor de 13,0 en el día 8;
 - (e) un número medio de flores masculinas mayor de 11,0 en el día 15; o
 - (f) un número medio de flores masculinas mayor de 7,0 en el día 22.
10. Fruto de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene el alelo HMBN como se define en la reivindicación 1.