

19



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 441**

21 Número de solicitud: 201890019

51 Int. Cl.:

**A01H 5/08** (2008.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**A01H 1/00** (2006.01)  
**A01H 4/00** (2006.01)  
**A01H 1/04** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**06.10.2016**

30 Prioridad:

**06.10.2015 EP 15188630**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**10.05.2018**

71 Solicitantes:

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

72 Inventor/es:

**DE GROOT, Erik;**  
**VAN DE WAL, Marion;**  
**BERENTSEN, Richard Bernard;**  
**CHIAPPARINO, Elena y**  
**OGUNDIWIN, Ebenezer**

74 Agente/Representante:

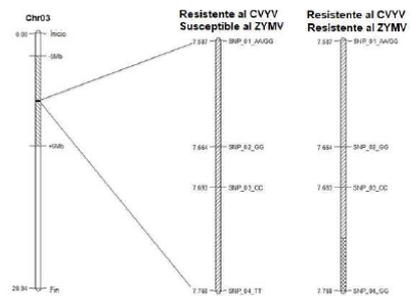
**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **Plantas de sandía con resistencia al virus de las venas amarillas del pepino (CVYV)**

57 Resumen:

La aplicación se refiere al campo de cultivo de plantas, en particular el cultivo de sandía. Se proporcionan plantas de sandía resistentes al CVYV (y semillas a partir de las cuales se pueden cultivar estas plantas). También se proporciona un QTL para resistencia al CVYV (cyv\_3.1) y marcadores y métodos para seleccionar plantas para la presencia del QTL.

Figura 1



**PLANTAS DE SANDÍA CON RESISTENCIA AL VIRUS DE LAS VENAS AMARILLAS  
DEL PEPINO (CVYV)**

**DESCRIPCIÓN**

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de cultivo de plantas y mejoramiento de plantas. Se proveen plantas de sandía resistentes al virus de las venas amarillas del pepino (CVYV) y a los marcadores SNP (Polimorfismo de Nucleótido Único) estrechamente ligados al locus de resistencia al CVYV. Estos marcadores pueden usarse para seleccionar plantas de sandía, o partes de plantas, que comprenden el locus de resistencia al CVYV y son resistentes al CVYV cuando el locus de resistencia está en forma homocigota en una planta diploide, o en tres o cuatro copias en un triploide o tetraploide respectivamente. Los marcadores también pueden usarse para distinguir plantas (o partes de plantas de tales plantas) que comprenden el locus de resistencia al CVYV de plantas (o partes de plantas) que carecen del locus de resistencia al CVYV. El locus de resistencia al CVYV es un locus recesivo único. El locus está ubicado en el cromosoma 3 del genoma de la sandía. En el mismo cromosoma Ling et al. (Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth Eucarpia Meeting, May 21-24th) reportó un marcador en el gen elF4E que está relacionado con la resistencia al ZYMV (Virus del mosaico amarillo del calabacín) conferida por un gen recesivo llamado zym. Las plantas de sandía cultivadas de la invención, que comprenden una introgresión homocigota de la sandía silvestre que confiere resistencia al CVYV, no comprenden resistencia a ZYMV y no comprenden el marcador en el gen elF4E reportado por Ling et al. 2008 (supra). El locus de resistencia al CVYV de la invención puede, por lo tanto, usarse solo, o puede combinarse opcionalmente con resistencia al ZYMV (el gen zym recesivo), para producir plantas con doble resistencia. Las plantas de sandía de la invención, que comprenden un fragmento de introgresión en el cromosoma 3, son plantas cultivadas de *C. lanatus* ssp. *vulgaris* que producen frutos comerciables con un grado brix de al menos 8.0 o 9.0, preferiblemente al menos 10.0, o al menos 11.0. Las plantas o partes de plantas comprenden así un genoma de sandía cultivada (*C. lanatus* ssp. *Vulgaris*), que comprende un fragmento de introgresión de una sandía silvestre en el cromosoma 3 (ya sea de una planta de la especie *C. lanatus* ssp. *Lanatus* o de una planta de la especie *C. lanatus* ssp. *mucosospermus*), por lo que dicho fragmento de introgresión comprende el locus de resistencia al CVYV. El locus del CVYV y/o el fragmento de introgresión pueden identificarse en las células, plantas, partes de plantas o ADN de los mismos mediante

marcadores estrechamente ligados, es decir, mediante el genotipo SNP (o haplotipo SNP) de uno o más de los marcadores SNP proporcionados en este documento.

#### Antecedentes de la invención

5 El CVYV es un potyvirus (familia Potyviridae) que causa daños severos en las cucurbitáceas, como el pepino, el melón, la sandía y el calabacín. El virus puede transmitirse mecánicamente y por el vector natural para el CVYV, que es la mosca blanca *Bemisia tabaci*. El vector de mosca blanca *B. tabaci* es endémico en muchas de las principales áreas de cultivo de sandía del mundo. El CVYV infecta tanto cultivos en el campo, como en túneles de plástico.

10 La resistencia contra el CVYV ha sido identificada en el melón y el pepino, pero aún no en la sandía. Por ejemplo, el documento WO2010/025747 describe una resistencia QTL contra el CVYV en melón, derivado del landrace Cuc6491. El documento WO2011003440 describe la resistencia al CVYV en pepino.

15 Los síntomas del CVYV en la sandía a veces son clorosis leves de la hoja, pero a menudo los síntomas externos son discretos o no se expresan. La infección por el CVYV solo se observa cuando se descubre que las frutas desarrollan una necrosis interna no vista desde el exterior, pero que hace que las frutas sean inadecuadas para el consumo.

20 La identificación del CVYV es posible por transcriptasa inversa PCT (RT-PCR) y por hibridación de ácido nucleico, como por ejemplo se describe en el 2007 OEPP/EPPO Bulletin 37, pp554-559, titulado "Cucumber vein yellowing virus (Ipomovirus)". Este documento también describe transmisiones mecánicas y de mosca blanca para probar plantas para identificar el CVYV.

25 Es un objeto de la invención proporcionar plantas de sandía cultivadas, *C. lanatus* ssp. *vulgaris*, y partes de tales plantas, que comprenden un locus de resistencia en el cromosoma 3, que confiere resistencia contra el CVYV cuando está en forma homocigota en una planta diploide, o cuando está en tres o cuatro copias en una planta triploide o tetraploide, respectivamente. Este locus es un Locus de Rasgo Cuantitativo (QTL) identificado en dos accesiones silvestres diferentes de *Citrullus lanatus* ssp. *lanatus* y *Citrullus lanatus* ssp. *mucosospermus*, que tienen frutos de pulpa blanca o amarillenta que  
30 son de sabor amargo y tienen un brix muy bajo (por ejemplo, un brix de 3.0 o menos), y este locus fue introgresado en sandía cultivada (*Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*) que tiene frutas comercializables, es decir, frutas de buena calidad con un brix de al menos 8.0 o 9.0 o preferiblemente al menos 10.0, 11.0 o superior. Este QTL que confiere resistencia al CVYV se denomina en este documento *cyv\_3.1*.

Las plantas de sandía cultivadas que comprenden cyv\_3.1 en una, dos, tres o cuatro copias incluyen plantas diploides o plantas doble haploides, plantas tetraploides y plantas triploides (por ejemplo, plantas híbridas triploides que producen frutos sin semillas), así como semillas de las que estas plantas pueden ser cultivadas, y cualquier parte de las plantas que comprende cyv\_3.1 (frutas, partes de frutas, portainjertos, vástagos, células, polen, anteras, óvulos, tallos, hojas, cotiledones, hipocótilos, flores, cultivos de células o tejidos in vitro, propagaciones in vitro, etc.).

También es un objeto de la invención proporcionar marcadores moleculares estrechamente relacionados con la resistencia al CVYV que confiere QTL cyv\_3.1 y el uso de uno o más de tales marcadores moleculares en a) plantas de sandía cultivadas que comprenden cyv\_3.1 en una (por ejemplo, heterocigotos) en un diploide), dos (por ejemplo, homocigotos en plantas diploides y haploides dobles), tres (en un triploide) o cuatro copias (en un tetraploide) y/o b) cribado de plantas, partes de plantas, células o ADN genómico para la presencia de uno o más de estos marcadores moleculares y, por lo tanto, para la presencia de cyv\_3.1. Dichos métodos de cultivo y métodos de cribado están incluidos en este documento.

#### Definición general

El verbo “comprender” y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitante para significar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido “un” o “una” no excluye la posibilidad de que esté presente más de un elemento, a menos que el contexto requiera claramente que exista uno y solo uno de los elementos. Por lo tanto, el artículo indefinido “un” o “una” significa “al menos uno”, por ejemplo “Una planta” se refiere también a varias plantas de células, etc. De manera similar, “una fruta” o “una planta” también se refiere a una pluralidad de frutas y plantas.

Como se usa en el presente documento, el término “planta” incluye la planta completa o cualquier parte o derivados de la misma, preferiblemente con la misma composición genética que la planta de la que se obtiene, tales como órganos de plantas (por ejemplo, frutas cosechadas o no cosechadas, hojas, flores, anteras, etc.), células de plantas, protoplastos de plantas, cultivos de tejidos de células de plantas a partir de las cuales pueden regenerarse plantas enteras, callos de plantas, cúmulos de células vegetales, trasplantes de plantas, plántulas, células vegetales intactas en plantas, clones de plantas o micropropagaciones, o partes de plantas, como esquejes de plantas, embriones, polen, anteras, óvulos, frutas (por ejemplo, tejidos u órganos cosechados), flores, hojas, semillas, plantas propagadas clonalmente, raíces, tallos, puntas de las raíces, injertos (vástago y/o

portainjertos) y similares. También se incluye cualquier etapa de desarrollo, como plántulas, esquejes antes o después del enraizamiento, etc. Cuando se hace referencia a las “semillas de una planta”, éstas se refieren a las semillas a partir de las cuales se puede cultivar la planta o las semillas producidas en la planta, después de la autofecundación o fecundación cruzada.

Como se usa en este documento, el término “variedad” o “cultivar” significa un agrupamiento de plantas dentro de un único taxón botánico del rango más bajo conocido, que puede definirse por la expresión de las características resultantes de un genotipo o combinación de genotipos dados.

El término “alelo(s)” significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen en un locus particular, todos los cuales alelos se relacionan con un rasgo o característica en un locus específico. En una célula diploide de un organismo, los alelos de un gen dado se encuentran en una ubicación específica, o locus (loci plural) en un cromosoma. Un alelo está presente en cada cromosoma del par de cromosomas homólogos. Una especie de planta diploide puede comprender una gran cantidad de alelos diferentes en un locus particular. Estos pueden ser alelos idénticos del gen (homocigotos) o dos alelos diferentes (heterocigotos).

“F1, F2, F3, etc.” se refiere a las generaciones consecutivas relacionadas después de un cruce entre dos plantas parentales o líneas parentales. Las plantas cultivadas a partir de las semillas producidas cruzando dos plantas o líneas se llaman generación F1. La autofecundación de las plantas F1 dan como resultado la generación F2, etc.

La planta “híbrida F1” (o semilla híbrida F1) es la generación obtenida al cruzar dos líneas parentales endogámicas. Por lo tanto, las semillas híbridas F1 son semillas a partir de las cuales crecen las plantas híbridas F1. Los híbridos F1 son más vigorosos y de mayor rendimiento, debido a la heterosis. Las líneas endogámicas son esencialmente homocigotas en la mayoría de los loci en el genoma.

Una “línea de planta” o “línea de reproducción” se refiere a una planta y su progenie. Como se usa en el presente documento, el término “línea endogámica” se refiere a una línea de planta que ha sido autofecundada repetidamente y es casi homocigota. Por lo tanto, una “línea endogámica” o “línea parental” se refiere a una planta que ha sufrido varias generaciones (por ejemplo, al menos 5, 6, 7 o más) de endogamia, dando como resultado una línea de planta con una alta uniformidad.

El término “gen” significa una secuencia de ADN (genómica) que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN mensajero (ARNm) en una

célula, y una región reguladora unida operativamente (por ejemplo, un promotor). Los diferentes alelos de un gen son, por tanto, diferentes formas alternativas del gen, que pueden estar en la forma de, por ejemplo, diferencias en uno o más nucleótidos de la secuencia de ADN genómico (por ejemplo, en la secuencia promotora, las secuencias de exón, secuencias de intrón, etc.), ARNm y/o secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

El término “locus” (loci plural) significa un lugar o lugares específicos o un sitio en un cromosoma donde, por ejemplo, se encuentra un QTL, un gen o marcador genético. El locus CVYV (o locus que confiere resistencia al CVYV) es, por lo tanto, la ubicación en el genoma de la sandía, donde se encuentra el QTL llamado *cyv\_3.1*. El locus *cyv\_3.1* se introduce en el cromosoma 3 de sandía cultivada (utilizando la asignación de cromosomas del genoma de sandía publicado que se encuentra en <http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi> bajo “Watermelon: Genome”, Watermelon: Genome” (97103) - versión 1” y como se describe en Guo S, Zhang J, Sun H, Salse J, Lucas W, Zhang H, Zheng Y, Mao L, Ren Y, Wang Z (2013) “El proyecto de genoma de sandía (*Citrullus lanatus*) y resecuenciación de 20 accesiones diversas “(Nature Genetics 45: 51-58) es decir, el *cyv\_3.1* se introduce en el genoma de la sandía cultivada (es decir, en el cromosoma 3) de una sandía silvestre.

Un “locus de rasgo cuantitativo” o “QTL” es un locus cromosómico que codifica para uno o más alelos que afectan la expresividad de un fenotipo distribuido continuamente (cuantitativo). La resistencia al CVYV que confiere locus de rasgo cuantitativo (o “CVYV QTL”) se denomina *cyv\_3.1* en este documento.

“Planta diploide” se refiere a una planta, parte(s) de planta vegetativa(s), o semilla a partir de la cual se puede cultivar una planta diploide, que tiene dos conjuntos de cromosomas, designado aquí como 2n.

Una “planta DH” o “planta doble haploide” es una planta diploide producida al duplicar el genoma haploide de la planta diploide usando, por ejemplo, técnicas in vitro. Una planta DH es, por lo tanto, homocigota en todos los loci.

“Planta triploide” se refiere a una planta, parte(s) de planta vegetativa(s), o semilla a partir de la cual se puede cultivar una planta triploide, que tiene tres conjuntos de cromosomas, designados aquí como 3n.

“Planta tetraploide” se refiere a una planta, parte(s) vegetal(es) vegetativa(s), o semilla a partir de la cual se puede cultivar una planta tetraploide, que tiene cuatro conjuntos de cromosomas, designado aquí como 4n.

“Planta polinizadora” o “polinizador” se refiere a la planta diploide (endogámica o híbrida), o partes de la misma (por ejemplo, su polen o vástago), adecuada como polinizador para inducir fructificación de las plantas triploides. Una planta polinizadora puede, por lo tanto, conducir a una buena fructificación de frutos (y un buen rendimiento de frutos triploides) de las plantas triploides, produciendo una cantidad apropiada de polen en el día apropiado y durante un período de tiempo apropiado.

La “planta triploide híbrida” o “triploide F1” o “triploide híbrido” es una planta triploide cultivada a partir de semillas híbridas, triploides obtenidas de la fertilización cruzada de un progenitor diploide macho con un progenitor tetraploide hembra. El progenitor masculino (la planta polinizadora) se usa para inducir la fructificación y la producción de semillas en un progenitor hembra tetraploide, dando como resultado frutos que contienen semillas triploides híbridas F1. Tanto el progenitor macho como el progenitor hembra utilizados para producir las semillas triploides F1 son endogámicos, de modo que cada línea parental es casi homocigota y estable.

Las “frutas sin semillas” son frutas triploides, producidas en una planta triploide después de que una planta polinizadora induce la fructificación de las frutas, que no contienen semillas maduras. La fruta puede contener uno o más óvulos pequeños, comestibles y blancos.

“Interplantar” se refiere a la combinación de dos o más tipos de semillas y/o trasplantes sembrados o trasplantados en el mismo campo, especialmente la siembra y/o trasplante de polinizadores en el mismo campo que las plantas híbridas triploides (para la producción de frutas sin semillas en las plantas triploides y producción de frutos diploides en las plantas polinizadoras). Por ejemplo, el polinizador puede sembrarse en filas separadas o intercalarse con las plantas triploides en la misma fila (por ejemplo, en colinas dentro de cada fila). Los polinizadores también se pueden plantar entre filas de triploides. También las semillas de polinizadores e híbridos triploides pueden mezclarse antes de la siembra, lo que da como resultado una siembra aleatoria. Los trasplantes de las plantas híbridas triploides y/o polinizadoras también pueden comprender un portainjerto de una planta diferente. Los portainjertos adecuados son conocidos en la técnica. Las plantas de sandía con un portainjerto diferente se conocen como “injertadas”.

“Plantar” o “plantada” se refiere a la siembra (siembra directa) o el trasplante de plántulas (plántulas) en un campo por máquina o a mano.

“Propagación vegetativa” o “propagación clonal” se refiere a la propagación de plantas del tejido vegetativo, por ejemplo, por métodos de propagación o injerto in vitro (usando

vástagos). La propagación in vitro implica el cultivo celular o tisular in vitro y la regeneración de una planta completa a partir del cultivo in vitro. El injerto implica la propagación de una planta original injertando en un portainjerto. Por lo tanto, los clones (es decir, las propagaciones vegetativas genéticamente idénticas) de la planta original pueden generarse mediante cultivo o injerto in vitro. “Cultivo celular” o “cultivo tisular” se refiere al cultivo in vitro de células o tejidos de una planta. “Regeneración” se refiere al desarrollo de una planta a partir del cultivo celular o cultivo de tejidos o propagación vegetativa. “Célula no propagante” se refiere a una célula que no puede regenerarse en una planta completa.

“Recesivo” se refiere a un alelo que expresa su fenotipo (por ejemplo, resistencia a CVYV) cuando no está presente un alelo dominante en el genoma. El *cyv\_3.1* de acuerdo con la invención da como resultado una planta resistente al CVYV cuando está presente en dos copias en una planta diploide, en cuatro copias en una planta tetraploide o en tres copias en una planta triploide, por lo que un alelo dominante está ausente en estas plantas. El alelo dominante se denomina en la presente memoria como alelo de tipo silvestre (WT), que se encuentra en plantas que carecen de la introgresión *cyv\_3.1*.

“Sandía cultivada” se refiere en este documento a *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris* y con buenas características agronómicas, especialmente produciendo frutas comercializables de buena calidad de fruta y uniformidad de fruta.

“Sandía silvestre” se refiere en este documento a *Citrullus lanatus* ssp. *lanatus* y *Citrullus lanatus* ssp. *mucosospermus*, produciendo frutos de mala calidad y baja uniformidad.

“Marcador de SNP” se refiere a un polimorfismo de nucleótido único entre sandía cultivada y silvestre y los marcadores de SNP proporcionados en este documento están estrechamente relacionados con el *cyv\_3.1* encontrado en las accesiones de sandía silvestre resistente al CVYV. SNP\_02 comprende una “G” (guanina) en el nucleótido 7.664.093 del cromosoma 3 en lugar de una ‘A’ (adenina) y SNP\_03 comprende una ‘C’ (citosina) en el nucleótido 7.693.225 del cromosoma 3, en lugar de una ‘T’ (Timina). El término “genotipo de SNP” se refiere al nucleótido presente en el SNP particular. Cuando se hace referencia al “genotipo de resistencia” o “genotipo CVYV” o “genotipo *cyv\_3.1*”, se hace referencia al nucleótido de la accesión silvestre resistente al CVYV. Por lo tanto, el “genotipo de resistencia” para SNP\_02 es ‘G’ (guanina) en el nucleótido 7.664.093 del cromosoma 3 y el de SNP\_03 es ‘C’ (citosina) en el nucleótido 7.693.225 del cromosoma 3. El otro nucleótido (alternativo) se refiere al nucleótido encontrado en la sandía cultivada que carece de la introgresión y puede denominarse genotipo WT o genotipo susceptible.

El término “haplotipo de SNP” se refiere al nucleótido presente en varias ubicaciones de SNP. Cuando se hace referencia al “haplotipo CVYV”, “haplotipo de resistencia” o “haplotipo cyv\_3.1”, se hace referencia al genotipo SNP de varios de los marcadores SNP vinculados a cyv\_3.1. Por ejemplo, el haplotipo-A comprende los nucleótidos G-G-C para  
 5 SNP\_01, SNP\_02 y SNP\_03, respectivamente. El haplotipo B comprende los nucleótidos A-G-C para SNP\_01, SNP\_02 y SNP\_03, respectivamente.

“Genoma de sandía cultivada” y “posición física en el genoma de sandía cultivada” y “cromosoma 3” se refiere al genoma físico de sandía cultivada, world wide web en <http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi> en “Watermelon: Genome”, “Watermelon  
 10 genome (97103) - version 1” y los cromosomas físicos y la posición física en los cromosomas. Entonces, por ejemplo, SNP\_01 está ubicado en el nucleótido (o 'base') posicionado físicamente en el nucleótido 7.586.752 del cromosoma 3, SNP\_02 está ubicado en el nucleótido (o 'base') posicionado físicamente en el nucleótido 7.664.093 del cromosoma 3, y SNP\_03 está ubicado en el nucleótido (o 'base') posicionado físicamente  
 15 en el nucleótido 7.693.225 del cromosoma 3. El cromosoma 3 tiene un tamaño físico de 0 a 28.9 Mb.

“Fragmento de introgresión” o “segmento de introgresión” o “región de introgresión” se refiere a un fragmento de cromosoma (o parte o región cromosómica) que se ha introducido en otra planta de la misma especie o especies relacionadas mediante cruzamiento o  
 20 técnicas de reproducción tradicionales, como retrocruzamiento, es decir, el fragmento introgresado es el resultado de los métodos de reproducción a los que hace referencia al verbo “introgresar” (como el retrocruzamiento). En la sandía, las accesiones de sandía silvestre se pueden utilizar para introgresar fragmentos del genoma silvestre en el genoma del genoma de la sandía cultivada. Tal planta de sandía cultivada tiene así un “genoma de  
 25 *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*” cultivado , pero comprende en el genoma un fragmento de una sandía silvestre, por ejemplo, un fragmento de introgresión de *Citrullus lanatus* ssp. *lanatus* o *Citrullus lanatus* ssp. *mucosospermus*. Así, por ejemplo, en este documento se proporciona una sandía cultivada que comprende un genoma de sandía cultivada, y en ese genoma un fragmento de introgresión de sandía silvestre en el cromosoma 3 que  
 30 comprende el QTL que confiere resistencia al CVYV y que se nombra aquí cyv\_3.1. Se entiende que el término “fragmento de introgresión” nunca incluye un cromosoma completo, sino solo una parte de un cromosoma. El fragmento de introgresión puede ser grande, por ejemplo, incluso tres cuartos o la mitad de un cromosoma, pero es preferiblemente más pequeño, como alrededor de 15 Mb o menos, como alrededor de 10 Mb o menos, alrededor  
 35 de 9 Mb o menos, alrededor de 8 Mb o menos, alrededor de 7 Mb o menos, alrededor de 6 Mb o menos, aproximadamente 5 Mb o menos, aproximadamente 4 Mb o menos,

aproximadamente 3 Mb o menos, aproximadamente 2.5 Mb o 2 Mb o menos, aproximadamente 1 Mb (igual a 1,000,000 pares de bases) o menos, o aproximadamente 0.5 Mb (igual a 500,000 pares de bases) o menos, como aproximadamente 200,000 bp (equivale a 200 kilopares de base) o menos, aproximadamente 100,000 bp (100 kb) o menos, aproximadamente 50,000 bp (50 kb) o menos, aproximadamente 30,000 bp (30 kb) o menos .

Un cromosoma 3 de sandía cultivada que comprende un fragmento de introgresión que comprende el QTL cyv\_3.1 que confiere resistencia al CVYV también se denomina aquí “cromosoma 3 recombinante”.

10 La “resistencia al CVYV” se refiere a la ausencia de síntomas del CVYV en hojas adultas (y preferiblemente también en frutas) o estadísticamente significativamente menos síntomas que las plantas de control susceptibles, como la variedad susceptible Sugar Baby. La resistencia al CVYV puede, por ejemplo, evaluarse usando un ensayo de resistencia al CVYV o, alternativamente, en el campo o túnel en áreas de cultivo donde se produce la  
 15 infección por CVYV natural. Diversos ensayos de resistencia al CVYV son posibles, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos, pero en general un ensayo de resistencia al CVYV puede, por ejemplo, implicar la inoculación artificial de la primera hoja verdadera expandida de una pluralidad de plántulas, opcionalmente seguido de una segunda inoculación de la hoja, por ejemplo, cuatro o cinco días después, incubar las plántulas y  
 20 controlar las plantas durante un período de tiempo adecuado y en condiciones adecuadas y evaluar los síntomas del virus una o más veces después de la inoculación (por ejemplo, 20 días, 30 días, 40 días, 50 días, 60 días después de la inoculación). El control susceptible debe ser severamente sintomático para que la prueba tenga éxito. Preferiblemente, se incluyen al menos 10, 11, 12, 13, 14 o más plantas por genotipo en cada replica y  
 25 preferiblemente se llevan a cabo varias réplicas. En un aspecto, al probar la resistencia, una línea o variedad se considera resistente si al menos el 70%, 80%, 90% o 100% de las plantas de la línea o variedad no muestran síntomas, mientras que al menos 50%, 60%, 70 %, 80%, 90% o más plantas de la línea o variedad de control susceptible muestran síntomas.

30 “Brix” o “grado Brix” o “° brix” se refiere al contenido medio total de sólidos solubles medido en varias frutas maduras utilizando un refractómetro. Preferiblemente, se calcula la media de al menos tres frutas, cada una medida entre el centro y la corteza de la fruta cortada abierta.

35 “Comercializable” en relación con la calidad de la fruta significa que los frutos de sandía son aptos para ser vendidos para consumo en fresco, con buen sabor (sin sabores

desagradables), un grado brix de al menos 9.0, preferiblemente al menos 10.0 o al menos 11.0 y preferiblemente también un color uniforme de pulpa de fruta, por ejemplo, blanco (por ejemplo, variedad de cream of Saskatchewan), amarillo (por ejemplo, variedad Yamato Cream 1), naranja (por ejemplo, variedad Tendersweet), rosa (por ejemplo, variedad Sadul), rojo rosado (por ejemplo, variedad Crimson Sweet), rojo (por ejemplo, variedad Sugar Baby) o rojo oscuro (por ejemplo, variedad Dixie Lee).

“Color uniforme de la pulpa de la fruta” significa que el color en todas las frutas maduras, cuando se corta abierto por la mitad (sección media), se distribuye uniformemente por toda la pulpa de la fruta, es decir, no en forma de parche. Por lo tanto, una fruta roja es roja en toda la pulpa de la fruta y no contiene manchas blancas. Un ejemplo de una fruta con color rojo uniforme es la variedad diploide Premium F1 (Nunhems).

La “distancia física” entre los loci (por ejemplo, entre marcadores moleculares y/o entre marcadores fenotípicos) en el mismo cromosoma es realmente la distancia expresada en bases o pares de bases (pb), kilobases o kilopares de bases (kb) o megabases o megapares de base (Mb).

La “distancia genética” entre loci (por ejemplo, entre marcadores moleculares y/o entre marcadores fenotípicos) en el mismo cromosoma se mide por frecuencia de cruce, o frecuencia de recombinación (RF) y se indica en centimorgans (cM). Un cM corresponde a una frecuencia de recombinación de aproximadamente 1%. Si no se pueden encontrar recombinantes, la RF es cero y los loci están muy cerca físicamente o son idénticos. Cuanto más alejados estén dos loci, mayor será la RF.

“Uniformidad” o “uniforme” se relaciona con las características genéticas y fenotípicas de una línea o variedad de planta. Las líneas endogámicas son genéticamente muy uniformes ya que son producidas por varias generaciones de endogamia. Del mismo modo, y los híbridos F1 y los híbridos triploides que se producen a partir de tales líneas endogámicas son altamente uniformes en sus características genotípicas y fenotípicas y el rendimiento.

El término “alelo de CVYV” o “alelo de resistencia al CVYV” se refiere a un alelo encontrado en el locus *cyv\_3.1* introgresado en sandía cultivada (sobre el cromosoma 3 cultivado de *C. lanatus* ssp. *Vulgaris*) de una sandía silvestre. El término “alelo del CVYV”, por lo tanto, también abarca los alelos del CVYV que pueden obtenerse a partir de diferentes sandías silvestres. Cuando no está presente ningún alelo dominante susceptible (tipo silvestre, WT) en el locus en el genoma (es decir, en la sandía diploide están presentes dos copias del alelo del CVYV, en sandía triploide 3 copias y en sandía tetraploide 4 copias), la línea de planta o la variedad será resistente al CVYV. En plantas de sandía cultivadas que carecen

- del fragmento de introgresión, el alelo encontrado en el mismo locus en el cromosoma 3 se denomina en la presente alelo de “tipo silvestre” (WT). Como el cyv\_3.1 es recesivo, no debe estar presente ningún alelo de tipo silvestre para expresar el fenotipo de resistencia al CVYV. Por lo tanto, dos cromosomas recombinantes 3 (en líneas o variedades de sandía
- 5 diploide), tres cromosomas recombinantes 3 (en líneas o variedades de sandía triploide) o cuatro cromosomas recombinantes 3 (en líneas o variedades de sandía tetraploide) deben estar presentes para expresar el fenotipo de resistencia al CVYV. Los genotipos de SNP y los haplotipos de SNP proporcionados en este documento son indicativos de la presencia del fragmento de introgresión que comprende cyv\_3.1.
- 10 Se dice que un elemento genético, un fragmento de introgresión o un gen o alelo que confiere un rasgo (tal como el de resistencia al CVYV) “obtenible de” o se puede “obtener de” o “derivable de” o se puede “derivar de” o “como está presente en” o “como se encuentra en” una planta o semilla o tejido o célula si puede transferirse desde la planta o semilla en la que está presente a otra planta o semilla en la que no está presente (como
- 15 en una línea o variedad susceptible al CVYV) que usa técnicas de reproducción tradicionales sin producir un cambio fenotípico de la planta receptora aparte de la adición del rasgo conferido por el elemento genético, locus, fragmento de introgresión, gen o alelo. Los términos se usan indistintamente y el elemento genético, locus, fragmento de introgresión, gen o alelo se puede transferir a cualquier otro transfondo genético que
- 20 carezca del rasgo. No solo se pueden utilizar semillas depositadas y que comprenden el elemento genético, locus, fragmento de introgresión, gen o alelo, sino también progenie/descendientes de tales semillas que se han seleccionado para retener el elemento genético, locus, fragmento de introgresión, gen o alelo, ser utilizados y abarcados en el presente documento, tales como variedades comerciales desarrolladas a partir de las
- 25 semillas depositadas o de descendientes o antepasados de las mismas. Del mismo modo, otras fuentes silvestres que contienen el elemento genético, locus, fragmento de introgresión, gen o alelo (por ejemplo, el cyv\_3.1 o una variante del mismo) se pueden identificar y usar para transferirlo a la sandía cultivada. Si una planta (o ADN genómico, célula o tejido de una planta) comprende el mismo (o variante) elemento genético, locus,
- 30 fragmento de introgresión, gen o alelo que puede obtenerse de las semillas depositadas, puede determinarse por el experto usando una o más técnicas conocidas en la técnica, tales como ensayos fenotípicos, secuenciación de genoma completo, análisis de marcadores moleculares, mapeo de rasgos, pintura de cromosomas, ensayos de alelismo y similares, o combinaciones de técnicas.
- 35 Una secuencia “Variante” u “ortóloga” o una “variante cyv\_3.1” se refiere a una resistencia al CVYV que confiere QTL (cyv\_3.1), o un fragmento de introgresión que comprende el

QTL, que se deriva de diferentes plantas silvestres de sandía que el cyv\_3.1 presente en NCIMB42449 o en NCIMB42450, o en NCIMB42666, pero cuya variante comprende uno o más del genotipo de resistencia de los marcadores de SNP, o de los haplotipos de SNP, unidos a cyv\_3.1 y en los que la secuencia genómica variante comprende identidad de secuencia sustancial con la SEQ ID NO que comprende el SNP (cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3), es decir, al menos 85%, 90%, 92%, 95%, 98% , 99% de identidad de secuencia o más. El SNP en dicha secuencia variante se denomina entonces “en un nucleótido correspondiente a” o “en una posición de nucleótido correspondiente a” la posición del SNP en la SEQ ID NO. Por lo tanto, cuando la secuencia original y la secuencia variante se alinean por pares en toda la longitud, un SNP en, por ejemplo, la posición 76 en la secuencia original estará, en la variante, presente en el nucleótido correspondiente al nucleótido 76 en la secuencia original. Por tanto, cuando se hace referencia aquí a un cierto genotipo de resistencia a SNP en una secuencia genómica específica (seleccionada de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3), esto también abarca el genotipo de resistencia SNP en variantes de la secuencia genómica, es decir, Genotipo de resistencia a SNP en una secuencia genómica que comprende al menos 85%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% de identidad de secuencia con la secuencia referida (seleccionada de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3). Por lo tanto, cualquier referencia en este documento a cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 3 en un aspecto también abarca una variante de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 3, comprendiendo dicha variante al menos 85%, 90%, 95%, 98 %, o 99% de identidad de secuencia con dicha secuencia.

El término “ensayo marcador” se refiere a un ensayo de marcador molecular que puede usarse para evaluar si en el cromosoma 3 de sandía cultivada está presente una introgresión de una sandía silvestre, cuyo fragmento de introgresión comprende el QTL de resistencia al CVYV (cyv\_3.1 o variante) (o si un acceso de sandía silvestre comprende el cyv\_3.1 o una variante del mismo en su genoma), determinando el genotipo de uno o más marcadores vinculados al cyv\_3.1, por ejemplo el genotipo de uno o más marcadores SNP seleccionados de SNP\_02 y SNP\_03 y (opcionalmente) cualquier marcador específico del genoma de sandía silvestre a una distancia de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03. El paso de “determinar el genotipo” también se puede denominar “genotipificación”. Opcionalmente, el ensayo marcador también puede incluir la genotipificación del SNP\_01 y/o SNP\_04 y/o cualquier marcador específico de genoma de sandía silvestre a una distancia de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb o menos de SNP\_01 y/o SNP\_04.

“Promedio” o “media” se refiere aquí a la media aritmética y ambos términos se usan indistintamente. El término “promedio” o “media” se refiere a la media aritmética de varias mediciones. El experto comprende que el fenotipo de una línea o variedad vegetal depende en cierta medida de las condiciones de crecimiento y que, por lo tanto, los medios aritméticos de al menos 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más plantas (o partes de plantas) son medido, preferiblemente en diseños experimentales aleatorizados con varias réplicas y plantas de control adecuadas (por ejemplo, plantas de la variedad Sugar Baby, o cualquier otra variedad o línea susceptible al CVYV) cultivadas en las mismas condiciones en el mismo experimento. “Estadísticamente significativo” o “estadísticamente significativo” diferente o “significativamente” diferente se refiere a una característica de una línea o variedad vegetal que, cuando se compara con un control adecuado, muestra una diferencia estadísticamente significativa en esa característica (por ejemplo, el valor p es menor que 0.05,  $p < 0.05$ , usando ANOVA) (media del) control

El término “técnicas de reproducción tradicionales” abarca cruce, retrocruzamiento, autofecundación, selección, producción doble haploide, duplicación de cromosomas, rescate de embriones, fusión de protoplastos, selección asistida por marcadores, reproducción por mutación, etc., todos conocidos por el obtentor (es decir, métodos distintos de modificación genética/transformación/métodos transgénicos), mediante el cual, por ejemplo, se puede obtener, identificar y/o transferir un cromosoma 3 recombinante.

El “retrocruzamiento” se refiere a un método de reproducción por el cual un rasgo (único), tal como el QTL de resistencia al CVYV, puede transferirse de un transfondo genético (a menudo inferior) (por ejemplo, una sandía silvestre, también denominada “donante”) en otro transfondo genético (a menudo superior) (también denominado “padre recurrente”), por ejemplo, sandía cultivada. Una descendencia de un cruce (por ejemplo, una planta F1 obtenida cruzando, por ejemplo, una sandía silvestre con una sandía cultivada, o una planta F2 o una planta F3, etc., obtenida por autofecundación de la F1), se “retrocruza” al progenitor con por ejemplo el transfondo genético superior, por ejemplo, al padre cultivado. Después del retrocruzamiento repetido, el rasgo del único transfondo genético (a menudo inferior) se habrá incorporado en el otro transfondo genético (a menudo superior).

La “selección asistida por marcador” o “MAS” es un proceso que utiliza la presencia de marcadores moleculares (como marcadores SNP), que están genéticamente vinculados a un locus particular o a una región cromosómica particular (por ejemplo, fragmento de introgresión), para seleccionar plantas por la presencia de locus o la región específica (por ejemplo, el fragmento de introgresión). Por ejemplo, un marcador molecular genéticamente ligado al QTL de resistencia CVYV, se puede usar para detectar y/o seleccionar plantas de sandía, o partes de plantas, que comprenden el QTL en el cromosoma 3. Cuanto más se

acerque el enlace genético del marcador molecular al locus, es menos probable que el marcador esté disociado del locus a través de la recombinación meiótica. Del mismo modo, cuanto más cerca estén dos marcadores entre sí, menos probable es que los dos marcadores se separen el uno del otro (y es más probable que ellos se cosegreden como una unidad).

5

Un marcador molecular dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2.5 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.4Mb, 0.3Mb, 0.2Mb, 0.1 Mb, 74kb, 50kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb o menos de otro marcador, o de un locus, se refiere a un marcador que se encuentra físicamente dentro de los 5 Mb, 3 Mb, 2.5 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.4Mb, 0.3Mb, 0.2Mb, 0.1 Mb, 74kb, 50kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb o menos, de la región de ADN genómico que flanquea al marcador (es decir, a cada lado del marcador). Ver, por ejemplo., el diagrama de la Figura 1, que muestra una región introgresada de sandía silvestre que comprende *cyv\_3.1*, en la que se muestran marcadores dentro de 5Mb de la región ampliada en el diagrama.

10

El “puntaje del LOD” (logaritmo (base 10) de probabilidades) se refiere a una prueba estadística utilizada a menudo para el análisis de ligamiento en poblaciones de animales y plantas. El puntaje LOD compara la probabilidad de obtener los datos de prueba si los dos loci (loci de marcador molecular y/o locus de rasgo fenotípico) están realmente vinculados, con la probabilidad de observar los mismos datos por pura casualidad. Los puntajes positivos de LOD favorecen la presencia de un vínculo y un puntaje de LOD mayor de 3.0 se considera evidencia para ligamiento. Un puntaje de LOD de +3 indica de 1000 a 1 probabilidades de que el ligamiento observado no se produzca por casualidad.

15

20

“Transgén” o “gen quimérico” se refiere a un locus genético que comprende una secuencia de ADN, tal como un gen recombinante, que se ha introducido en el genoma de una planta mediante transformación, tal como transformación mediada por *Agrobacterium*. Una planta que comprende un transgén integrado establemente en su genoma se denomina “planta transgénica”.

25

Una “secuencia de ácido nucleico aislada” o “ADN aislado” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ya no está en el entorno natural del que se aisló, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en una célula hospedadora bacteriana o en el genoma nuclear o plastídico de la planta. Cuando se hace referencia a una “secuencia” en este documento, se entiende que se hace referencia a la molécula que tiene dicha secuencia, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico.

30

Una “célula hospedadora” o una “célula hospedadora recombinante” o “célula transformada” son términos que se refieren a una nueva célula individual (u organismo)

que surge como resultado de al menos una molécula de ácido nucleico, que se ha introducido en dicha célula. La célula hospedadora es preferiblemente una célula vegetal o una célula bacteriana. La célula hospedadora puede contener el ácido nucleico como una molécula de replicación extracromosómicamente (episomal), o comprende el ácido nucleico integrado en el genoma nuclear o de plástido de la célula hospedadora, o como cromosoma introducido, por ejemplo, minicromosoma.

La “identidad de secuencia” y la “similitud de secuencia” se pueden determinar mediante la alineación de dos secuencias de péptido o dos secuencias de nucleótidos usando algoritmos de alineación globales o locales. Entonces, las secuencias pueden denominarse “sustancialmente idénticas” o “esencialmente similares” cuando están alineadas de manera óptima, por ejemplo, los programas GAP o BESTFIT o el programa “Needle” de Emboss (utilizando los parámetros predeterminados, ver a continuación) comparten al menos un cierto mínimo porcentaje de identidad de secuencia (como se define más abajo). Estos programas utilizan el algoritmo de alineación global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias en toda su longitud, lo que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de huecos. Generalmente, se utilizan los parámetros por defecto, con una penalización por creación de hueco = 10 y penalización por extensión de hueco = 0.5 (tanto para alineamientos de nucleótidos como de proteínas). Para los nucleótidos, la matriz de puntuación por defecto utilizada es DNAFULL y para las proteínas la matriz de puntuación por defecto es Blosum62 (Henikoff y Henikoff, 1992, PNAS 89, 10915-10919). Las alineaciones de secuencia y los puntajes para la identidad de secuencia porcentual pueden determinarse, por ejemplo, usando programas de ordenador, tales como EMBOSS, tal como está disponible en el world wide web en [ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)). Alternativamente, la identidad o similitud de secuencia puede determinarse buscando en bases de datos tales como FASTA, BLAST, etc., pero los aciertos deben recuperarse y alinearse en pares para comparar la identidad de secuencia. Dos proteínas o dos dominios de proteínas, o dos secuencias de ácidos nucleicos tienen “identidad de secuencia sustancial” si la identidad de secuencia de porcentaje es al menos 85%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% o más (por ejemplo, al menos 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, 99.9 o más (según lo determinado por “needle” de Emboss usando los parámetros por defecto, es decir, penalización de creación de hueco = 10, penalización de extensión de hueco = 0.5, usando la matriz de puntuación DNAFULL para ácidos nucleicos y Blosum62 para proteínas).

Cuando se hace referencia a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ADN genómico) que tiene una “identidad de secuencia sustancial con” una secuencia de referencia o que tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, por ejemplo, al menos

85%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99%, 99.2%, 99.5%, 99.9% de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de referencia, en una realización dicha secuencia de nucleótidos se considera sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos dada y puede identificarse usando condiciones de hibridación rigurosas. En otra realización, la  
5 secuencia de ácido nucleico comprende una o más mutaciones en comparación con la secuencia de nucleótidos dada, pero aún puede identificarse usando condiciones de hibridación rigurosas.

Las “condiciones de hibridación rigurosas” pueden usarse para identificar secuencias de nucleótidos, que son sustancialmente idénticas a una secuencia de nucleótidos dada. Las  
10 condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C más bajas que el punto de fusión térmico (T<sub>m</sub>) para las secuencias específicas a una fuerza iónica y pH definidos. La T<sub>m</sub> es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda  
15 perfectamente adaptada. Se elegirán condiciones típicamente rigurosas en las que la concentración de sal es de aproximadamente 0.02 molar a pH 7 y la temperatura es al menos 60°C. Disminuir la concentración de sal y/o aumentar la temperatura aumenta la rigurosidad. Las condiciones rigurosas para las hibridaciones de ARN-ADN (transferencias Northern usando una sonda de, por ejemplo, 100nt) son, por ejemplo, aquellas que incluyen  
20 al menos un lavado en 0.2X SSC a 63°C durante 20 min, o condiciones equivalentes. Las condiciones rigurosas para la hibridación ADN-ADN (transferencias Southern usando una sonda de, por ejemplo, 100nt) son, por ejemplo, aquellas que incluyen al menos un lavado (habitualmente 2) en 0.2X SSC a una temperatura de al menos 50°C, habitualmente alrededor de 55°C. durante 20 minutos o condiciones equivalentes. Ver también Sambrook  
25 et al. (1989) y Sambrook y Russell (2001).

La “prueba de alelismo” se refiere a una prueba genética mediante la cual se puede probar analizar si un fenotipo, por ejemplo, la resistencia al CVYV, observada en dos líneas o variedades de plantas, está determinada por el mismo gen o locus o por diferentes genes o loci. Por ejemplo, las plantas a probarse cruzan entre sí (preferiblemente después de la  
30 autofecundación para asegurar que son homocigotas), se determina la segregación de los fenotipos entre la F1 o la progenie posterior de autofecundación o retrocruzamiento. La proporción de segregación indica si los genes o loci son alélicos o si son diferentes. Entonces, por ejemplo, si los alelos son del mismo gen, las plantas F1 (producidas cruzando dos plantas homocigotas) tendrán (100%) el mismo fenotipo, mientras que tal vez  
35 no sea el caso si los alelos son de genes diferentes. Del mismo modo, en las plantas F2, la segregación fenotípica indicará si se trata de genes iguales o diferentes.

“Mapeo fino” se refiere a los métodos mediante los cuales se puede determinar la posición de un QTL de forma más precisa (restringida). Por ejemplo, una población grande que se segrega por el rasgo puede analizarse para la segregación del rasgo (por ejemplo, resistencia al CVYV) y los marcadores de ADN en el cromosoma 3 y plantas que comprenden eventos de recombinación en la región del cromosoma 3 que comprende el locus de resistencia al CVYV (véase, por ejemplo, la Figura 1, área rayada) se puede seleccionar, para determinar en qué par de marcadores SNP se encuentra el QTL. También se pueden buscar marcadores adicionales entre el par de marcadores más vinculados para reducir el intervalo en el que se encuentra el QTL.

10 Figura 1:

La Figura 1 muestra en el diagrama de la izquierda un cromosoma 3 recombinante que comprende un fragmento de introgresión de sandía silvestre (región rayada) que abarca una región de 5 Mb a cada lado de los marcadores de SNP. Las regiones cultivadas de sandía no tienen rayas (blancas). En las dos ampliaciones (centro y diagrama de la derecha) se muestran los marcadores SNP SNP\_01 a SNP\_04 para una planta resistente al CYCV y sensible al ZYMV (diagrama central) y para una planta resistente al CVYV y resistente al ZYMV (diagrama de la derecha), que incluye los Genotipos SNP y las ubicaciones (la ubicación del cromosoma está indicada en Mb, por ejemplo, 7.5Mb para SNP\_01 y 7.7Mb para SNP\_04): SNP\_01 puede ser AA o GG dependiendo del haplotipo; SNP\_02 tiene el genotipo de resistencia GG; SNP\_03 tiene el genotipo de resistencia CC; y SNP\_04 tiene el genotipo TT (que indica susceptibilidad a ZYMV) o el genotipo GG (que indica resistencia a ZYMV, es decir, presencia de una región (región rayada) que comprende el locus zym en forma homocigota).

Descripción detallada

25 Los inventores encontraron un QTL recesivo en el cromosoma 3 de los accesos de sandía silvestre, que comprende un locus que confiere resistencia al CVYV. Encontraron dos haplotipos diferentes vinculados al QTL que confiere resistencia, el haplotipo A comprendía los nucleótidos G-G-C en SNP\_01, SNP\_02 y SNP\_03, respectivamente, y el haplotipo B comprendía los nucleótidos A-G-C en SNP\_01, SNP\_02 y SNP\_03, respectivamente.

30 Además, SNP\_02 y SNP\_03 (los dos SNP comunes de ambos haplotipos de resistencia) estaban estrechamente relacionados con el locus cyv\_3.1 y se usaron para retrocruzar el QTL cyv\_3.1 en sandía cultivada susceptible al CVYV a partir de dos accesos diferentes de sandía silvestre, introduciendo así la resistencia al CVYV a la sandía cultivada produciendo frutas comercializables.

Semillas de dos líneas endogámicas diploides que comprenden cyv\_3.1 en forma homocigota han sido depositadas por Nunhems B.V. en la NCIMB bajo los números de acceso NCIMB 42449 y NCIMB42450. Estas dos líneas comprenden SNP\_02 y SNP\_03 en forma homocigota y tienen el haplotipo B de SNP. Las frutas son semillas, frutas de pulpa roja que tienen un brix de 11.0 y son frutas comercializables. Las plantas son resistentes al CVYV y susceptibles a ZYMV (y también carecen del marcador eIF4E de Ling et al., 2008 supra). Una de las líneas tiene frutas con corteza tipo Crimson Sweet (NCIMB 42449), la otra (NCIMB42450) tiene frutas con una corteza Jubilee (como en Premium F1). El peso promedio del fruto es de 7 kg y 8 kg respectivamente. Además, se han generado varias líneas endogámicas cultivadas que comprenden el locus cyv\_3.1, que tienen pesos de fruta promedio que varían de aproximadamente 2 kg a aproximadamente 12 kg.

Semillas de otra línea endogámica elite diploide que comprende cyv\_3.1 en forma homocigota han sido depositadas por Nunhems BV en la NCIMB bajo el número de acceso NCIMB 42666. Esta línea comprende SNP\_02 y SNP\_03 en forma homocigota y tiene el haplotipo A de SNP. Los frutos son frutos con semilla de pulpa roja que son comercializables.

Tabla 1 - Marcadores de SNP vinculados a cyv\_3.1 y ubicación de SNP en el cromosoma 3 del genoma de sandía cultivada publicado en la World Wide Web [icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi](http://icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi) bajo "Watermelon: "Genome", Watermelon Genome (97103) - versión 1"

Nombre del marcador SNP	introgresión cyv_3.1/cyv_3.1 de C. lanatus ssp. mucospermus	introgresión cyv_3.1/cyv_3.1 de C. lanatus ssp. lanatus	Variedad de sandía sin cyv_3.1 (WT/WT)	Secuencia genómica (dirección 5' a 3') que comprende el SNP en el nucleótido 76 de la secuencia y la ubicación del SNP físico en el cromosoma 3 (*) de la sandía cultivada
SNP_01	<b>GG</b>	<b>AA</b>	GG	GGGGCGAATAAAATAAAATA AATAAATTTGGTAGGGTTGG AGTGGAATAAAGGAGATTTT ATTTTATTTGGTTGA[ <b>A/G</b> ]* GAAACAAAAGGGAAAATT GGAATTAAGGGTTTAAGGAG GGAGAGGAATTAGGGTTTAG TTTAATCCCACCCTC (SEQ ID NO: 1) *Localizada en el nucleotido 7.586.752

SNP_02	GG	GG	AA	TCAGTCATAGTATAGTGGAA TATTTGACTGCAGGTATAAG ACTCAACTTCAGAAAGATCC AGACCTTTTTTTTAA[A/G]* AGAGAGAGAGAGAGAGAGA G AGAGAGAACTAGAAACAACA ATTTCCACCAAAGAATGAA AAGAGACTAAGACTC (SEQ ID NO: 2) *Localizada en el nucleótido 7.664.093
SNP_03	CC	CC	TT	CGAGTTGGCTATTAGAGTTG ATCGTTGGAGATGATTGACT GAGTTAGTTGCTAGAGGTGG TCGTTGAGTTGGTTG[C/T]* CGAAGGTATTCGTCAGGGCT AGTTGCGAAGTTGGGCTTTG GAGAAGTGGAGATAGTCATT GTAGTTGATTGATGG (SEQ ID NO: 3) *Localizada en el nucleótido 7.693.225
Fenotipo	resistente al CVYV	resistente al CVYV	susceptible a CVYV	
haplotipo del SNP	Haplotipo A de resistencia: G- G-C para SNP_01, SNP_02 y SNP_03	Haplotipo B de resistencia: A- G-C para SNP_01, SNP_02 y SNP_03		

Plantas de sandía cultivadas diploides, semillas y partes de plantas, que comprende cyv 3.1

5 En un aspecto de la invención (semilla de) una planta de sandía cultivada diploide de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*, donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3, donde dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia al CVYV y es opcionalmente detectable por (o comprende) un marcador seleccionado del grupo que consiste en:

- a) una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o en el nucleótido 76 de una secuencia que comprende al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
- 5 b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o en el nucleótido 76 de una secuencia que comprende al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y/o (opcionalmente)
- 10 c) un marcador molecular específico del genoma de sandía silvestre dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03.

La planta de sandía anterior comprende así un fragmento de introgresión en el cromosoma 3 (que comprende cyv\_3.1), que es detectable por el genotipo de resistencia de SNP\_02 y/o SNP\_03 y/u opcionalmente otro marcador específico del genoma de sandía silvestre dentro de 5 Mb de SNP\_02 o SNP\_03. Aunque SNP\_02 y SNP\_03 están estrechamente

15 relacionados con el QTL, es posible generar fragmentos de introgresión que han perdido SNP\_02 y/o SNP\_03, pero conservan el QTL y uno o más marcadores diferentes de genoma de sandía silvestre estrechamente vinculados a cyv\_3.1, como se menciona en c) arriba. La contribución importante a la técnica es que el fragmento de introgresión comprende el locus de resistencia al CVYV al que se hace referencia aquí como cyv\_3.1.

20 La planta no necesita ser fenotípicamente resistente al CVYV, ya que el locus de resistencia CVYV puede estar en forma heterocigota (solo puede estar presente un cromosoma 3 recombinante). Por lo tanto, el genotipo diploide para SNP\_02 puede ser heterocigoto GA (guanina/adenina) u homocigoto GG (guanina/guanina) y el genotipo diploide para SNP\_03 puede ser heterocigoto CT (citosina/timina) u homocigoto CC (citosina/citosina). En otras

25 palabras, una planta puede ser heterocigota para el fragmento de introgresión (y el QTL), que tiene solo una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02), o en un nucleótido correspondiente al nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 en una secuencia variante, es decir, en una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, y solo una citosina

30 en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP\_03), o en un nucleótido correspondiente al nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 en una secuencia variante, es decir, en una secuencia que comprende al menos 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; o puede ser homocigoto para el fragmento de introgresión (y el QTL) que tiene dos guaninas en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2

35 (SNP\_02) o en un nucleótido correspondiente al nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 en una secuencia variante, es decir, en una secuencia de una secuencia que comprende al menos

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 y que tiene dos citosina (C) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o en un nucleótido correspondiente al nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 en una secuencia variante, es decir, en una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%,  
 5 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3. Lo mismo se aplica a los marcadores específicos de sandía silvestre-genoma, vinculados a cyv\_3.1, en c) arriba, es decir, este marcador puede ser heterocigoto u homocigoto. Los marcadores en c) se pueden identificar, por ejemplo., secuenciando la región. Estos marcadores pueden ser cualquier marcador que esté relacionado con el cyv\_3.1 y que sean  
 10 polimórficos entre el ADN genómico de sandía silvestre y el ADN genómico de sandía cultivada, como marcadores SNP, inserciones o deleciones de uno o más nucleótidos (por ejemplo, marcadores INDEL), marcadores AFLP, etc.

En un aspecto, el fragmento de introgresión está en forma homocigota, y el fragmento de introgresión que comprende el locus del cyv\_3.1 del CVYV está en forma homocigota, por  
 15 lo que la planta es resistente al CVYV, como por ejemplo., determinable en un ensayo de resistencia al CVYV y/o un ensayo de marcador molecular. Por lo tanto, en un aspecto el SNP\_02, SNP\_03 y/o el marcador específico del genoma de sandía silvestre son homocigóticos, es decir, SNP\_02 y SNP\_03 tienen el genotipo de resistencia GG y CC, respectivamente, y la planta es resistente al CVYV, por ejemplo., cuando se ensaya en un  
 20 ensayo de resistencia al CVYV y preferiblemente también cuando se cultiva en el campo o túnel bajo presión del CVYV natural.

Como se mencionó, los marcadores específicos del genoma de sandía silvestre pueden ser cualquier tipo de marcador molecular presente en el fragmento de introgresión que comprende cyv\_3.1 y distinguir el fragmento de introgresión de la región del cromosoma 3  
 25 de sandía cultivada (genotipo WT, que carece del cyv\_3.1), por ejemplo, uno o más marcadores SNP, marcadores CAPS, marcadores RFLP, marcadores AFLP, marcadores de microsatélites, marcadores minisatélites, inserciones o deleciones de uno o más nucleótidos (por ejemplo, INDEL), etc. Por lo tanto, un “marcador molecular específico de genoma de sandía silvestre” es un marcador que es polimórfico o distinto entre el fragmento  
 30 de introgresión del genoma de sandía silvestre que comprende cyv\_3.1 y el genoma de sandía cultivada que carece del fragmento de introgresión. Ya se han proporcionado aquí marcadores de SNP polimórficos, pero los expertos en la materia pueden desarrollar fácilmente otros marcadores, por ejemplo, mapeando o mapeando fino o secuenciando la región en el cromosoma 3 que comprende el fragmento de introgresión. Por ejemplo, la  
 35 región del cromosoma 3 de las plantas depositadas, que comprende el fragmento de introgresión en forma homocigota, puede secuenciarse y compararse con la misma región

del cromosoma 3 de sandía cultivada para identificar otros marcadores moleculares específicos del genoma de sandía silvestre en 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20 kb, 10 kb, 2 kb, 1 kb o menos de SNP\_02 o de SNP\_03, es decir, otros marcadores de sandía silvestre específicos del genoma vinculados a SNP\_2 y/o SNP\_03 y por lo tanto indicativo del fragmento de introgresión que comprende cyv\_3.1.

Por lo tanto, en un aspecto, dicho fragmento de introgresión es detectable por (o comprende) un marcador seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un genotipo diploide GG (guanina/guanina) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% , 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
- b) un genotipo diploide CC (citosina/citosina) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% , 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y/o
- c) un marcador molecular específico del genoma de sandía silvestre dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20 kb, 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03 cuyo marcador está en forma homocigota.

Cuando se hace referencia en este documento a un genotipo de SNP en una posición específica, por ejemplo., en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2, “o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO”, esto significa que el genotipo SNP está presente en una secuencia variante en un nucleótido correspondiente al mismo nucleótido (por ejemplo, correspondiente al nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2) en la secuencia variante, es decir, en una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO mencionada. Puede ser, por ejemplo, que la secuencia variante es uno o unos pocos nucleótidos más corta, pero cuando se alinea por pares la secuencia variante con la SEQ ID NO mencionada, se puede ver que el nucleótido de la secuencia variante corresponde al mismo nucleótido. En la secuencia variante, esto puede ser, por ejemplo, el número de nucleótidos 75 o 77 de esa secuencia variante que corresponde al nucleótido 76 de la secuencia mencionada.

La planta anterior es, por lo tanto, también resistente al CVYV en su fenotipo, como se puede determinar en un ensayo de resistencia al CVYV como por ejemplo, descrito en los Ejemplos, o en el campo o túnel en áreas donde el CVYV ocurre naturalmente. Se entiende que en un ensayo de resistencia al CVYV se ensaya una pluralidad de plantas (por ejemplo, al menos 10, 11, 12, 13, 14 o más) de la línea o variedad, preferiblemente en varias

repeticiones (por ejemplo, 2, 3, 4 o más), y opcionalmente en varias ubicaciones, e incluyendo una pluralidad de plantas de una variedad de control susceptible en el mismo ensayo. Las semillas de las líneas depositadas se pueden incluir como control positivo. Todas las variedades actuales de sandía son susceptibles al CVYV, por lo que cualquier  
5 variedad o línea parental de dicha variedad se puede usar como control susceptible, por ejemplo, se puede usar la variedad diploide antigua Sugar Baby o Dumara (Nunhems).

En una realización específica de la invención (semilla de) una planta de sandía cultivada diploide de la especie *Citrullus lanatus* ssp *vulgaris* se proporciona, en donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el  
10 cromosoma 3, donde dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia al CVYV y es detectable por (o comprende):

- a) una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID N°: 2 (SNP\_02) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
- 15 b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

La planta comprende el locus de resistencia al CVYV en forma homocigota o heterocigota.

En un aspecto, la planta comprende el fragmento de introgresión en forma homocigota, es decir, el fragmento de introgresión es detectable por (o comprende):  
20

- a) un genotipo diploide GG (Guanina/Guanina) para el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% , 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
- 25 b) un genotipo diploide CC (citosina/citosina) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% , 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

Las plantas diploides anteriores pueden en una realización tener haplotipo A de SNP o haplotipo B de SNP. Por lo tanto, en un aspecto las plantas comprenden el haplotipo A de SNP que tiene GGC para SNP\_01 - SNP\_02 y SNP\_03, respectivamente (por ejemplo, en  
30 forma diploide el haplotipo A de SNP es GG-GG-CC en forma homocigota, o GG-GA-CT en forma heterocigota). En otro aspecto, la planta comprende el haplotipo B de SNP que tiene A-G-C para SNP\_01 -SNP\_02 y SNP\_03, respectivamente (por ejemplo, en forma

diploide el haplotipo A de SNP es AA-GG-CC en forma homocigota, o AG-GA-CT en forma heterocigota). Por lo tanto, en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 1 (SNP\_01) o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, el genotipo de SNP puede ser una Guanina  
5 o una Adenina. SNP\_01 puede distinguir los dos diferentes haplotipos de resistencia.

Cualquiera de las plantas de sandía diploide descritas anteriormente puede ser de cualquier tipo, es decir, el locus de resistencia *cyv\_3.1* puede introducirse en cualquier sandía cultivada para producir líneas o variedades que comprenden el locus del CVYV. Las sandías cultivadas producen diversos tamaños de fruta (por ejemplo, muy pequeñas, como  
10 se describe en WO2012069539, por ejemplo, menos de 0.9 kg o incluso igual o inferior a 0.65 kg; tamaño personal de aproximadamente 3-7 libras, es decir, alrededor de 1.4 a 3.2 kg; tamaños de hielera de aproximadamente 6 a 12 libras, es decir, de aproximadamente 2.7 a 5.5 kg, y tamaños más grandes de hasta 35 libras, es decir, alrededor de 15.9 kg), colores de pulpa de fruta y formas de fruta y con diferentes colores de corteza. El locus  
15 *cyv\_3.1* puede, por lo tanto, introducirse en sandía cultivada produciendo cualquier forma de fruto (por ejemplo, alargado, oval, oval alargado, bloque o bloque alargado, esférico o redondo), superficie de fruta (por ejemplo, surcada, lisa), color de pulpa (por ejemplo rojo, rojo oscuro, rojo escarlata, rojo coral, naranja, salmón o rosa, amarillo, amarillo canario o blanco), color de la corteza (por ejemplo, verde claro; verde oscuro; verde rayado con rayas  
20 angostas, medianas o anchas; tipos grises; o sin manchas, amarillo dorado, corteza de tipo Crimson, corteza de tipo Jubilee, corteza de tipo Allsweet, negro/verde oscuro), grosor de la corteza, dureza de la corteza, patrón de corteza (por ejemplo, rayado, sin rayas, enmallado), estructura de pulpa/firmeza de pulpa, contenido de licopeno y/o vitamina, diferentes proporciones de azúcar a ácido, muy buen sabor de fruta, etc. por reproducción.  
25 Ver Guner y Wehner 2004, Hort Science 39(6): 1175-1182, en particular páginas 1180-1181 que describen los genes de las características de la fruta. Los principales objetivos de cultivo son: madurez temprana, alto rendimiento de fruto, alta calidad interna del fruto (buen color uniforme, alto contenido de azúcar, proporción adecuada de azúcar: ácido, buen sabor, alto contenido de vitaminas y licopeno, textura de pulpa firme, textura de pulpa  
30 no fibrosa, ausencia de defectos como corazón hueco, necrosis de la corteza, podredumbre del extremo de la flor o punto de cruz y buenas características de la corteza y resistencia al agrietamiento).

Los frutos producidos por la línea diploide o variedad son preferiblemente frutas comercializables.

35 En un aspecto, el brix promedio es al menos 6.0, 7.0, 8.0 o al menos 9.0, preferiblemente al menos 10.0, más preferiblemente al menos 11.0 o más.

El color de la fruta puede ser de cualquier color, como rojo, rojo oscuro, rojo escarlata, rojo coral, naranja, salmón, rosa, rojo rosáceo, amarillo, amarillo canario o blanco. Preferiblemente, el color de la pulpa de la fruta es uniforme.

5 El diploide puede ser una línea endogámica o un híbrido diploide, producido al cruzar dos líneas endogámicas. En un aspecto, ambas líneas progenitoras endogámicas son homocigotas para *cyv\_3.1*, de modo que el híbrido también es homocigoto. La planta diploide puede ser una línea endogámica, una variedad, un híbrido diploide F1, una variedad OP (polinizada abierta), una planta polinizadora (por ejemplo, un polinizador dedicado que produce frutas comercializables como se describe en WO2012069539) o  
10 cualquier otro diploide cultivado, incluyendo cualquier planta propagada clonalmente. Como el fenotipo de resistencia CVYV se expresa preferiblemente fenotípicamente, el fragmento de introgresión es en un aspecto homocigoto en el diploide, como lo son uno o más de los marcadores vinculados a *cyv\_3.1*.

15 El fragmento de introgresión de sandía silvestre que comprende *cyv\_3.1* puede ser de diversos tamaños, por ejemplo, aproximadamente 15 Mb o menos, aproximadamente 10Mb o menos, aproximadamente 9Mb o menos, aproximadamente 8Mb o menos, aproximadamente 7Mb o menos, aproximadamente 6Mb o menos, aproximadamente 5Mb o menos, aproximadamente 4Mb o menos, aproximadamente 3Mb o menos, aproximadamente 2.5Mb o 2 Mb o menos, aproximadamente 1 Mb (igual a 1,000,000 pares  
20 de bases) o menos, o aproximadamente 0.5 Mb (igual a 500,000 pares de bases) o menos, como aproximadamente 200,000 bp (igual a 200 kilopares de base) o menos, aproximadamente 100,000 bp (100 kb) o menos, aproximadamente 50,000 bp (50 kb) o menos, aproximadamente 30,000 bp (30 kb) o menos. Generalmente se prefieren fragmentos de introgresión más pequeños, ya que los rasgos negativos se pueden ubicar  
25 en el mismo fragmento. El tamaño de un fragmento de introgresión se puede reducir mediante recombinación meiótica (por ejemplo, al autofecundar la planta) y seleccionando plantas de progenie recombinante que tienen un fragmento de introgresión más pequeño pero que retiene *cyv\_3.1*, usando, por ejemplo, un ensayo fenotípico y/o un ensayo de marcador molecular como se describe en este documento. Si SNP\_01 y/o SNP\_02 y/o  
30 SNP\_03 se pierden por recombinación, pero la planta retiene el locus *cyv\_3.1*, la selección fenotípica se puede utilizar para seleccionar una planta que retiene *cyv\_3.1* y/o el fragmento de introgresión se puede detectar usando otro método, por ejemplo, secuenciar la región del cromosoma 3 donde se encuentra el QTL (por ejemplo, la región entre aproximadamente 2.50 Mb y aproximadamente 12.8 Mb del cromosoma 3, ver Figura 1) u  
35 otros marcadores silvestres específicos del genoma de sandía vinculados a *cyv\_3.1*. Dichos otros marcadores específicos del genoma de sandía silvestre se pueden desarrollar

usando métodos conocidos por la persona experta, tales como mapeo fino, secuenciación, etc.

5 En un aspecto, el fragmento de introgresión de la invención (que comprende cyv\_3.1 o una variante del mismo y en el que el fragmento de introgresión se introgressa de una planta silvestre de sandía) es un fragmento que comprende (o abarca) la región que comienza en 2.50 Mb y termina en 12.80 Mb del cromosoma 3 y comprende el locus cyv\_3.1 o una variante del mismo.

10 En otro aspecto, el fragmento de introgresión de la invención (que comprende cyv\_3.1 o una variante del mismo y en el que el fragmento de introgresión está introgressado de una planta silvestre de sandía) es un fragmento que comprende un fragmento (parte) más pequeño de la región que comienza en 2.50 Mb y termina a 12.80 Mb del cromosoma 3, por ejemplo teniendo un tamaño de, por ejemplo, 9Mb, 8Mb, 7Mb, 6Mb, 5Mb, 4Mb, 3Mb, 2Mb, 1Mb, 0.5Mb, 100kb, 50kb, 35kb, 30kb, 20kb, o menos (como se describió anteriormente) y que comprenden el locus cyv\_3.1 o una variante del mismo. En un  
15 aspecto, la parte tiene al menos 5kb, 10kb, 20kb de tamaño o más.

En otro aspecto adicional, el fragmento de introgresión de la invención (que comprende cyv\_3.1 o una variante del mismo y en el que el fragmento de introgresión es introgressado de una planta silvestre de sandía) consiste de un fragmento más pequeño (subfragmento) de la región comenzando en 2.50 Mb y terminando en 12.80 Mb del cromosoma 3, por  
20 ejemplo, teniendo un tamaño de, por ejemplo, 9Mb, 8Mb, 7Mb, 6Mb, 5Mb, 4Mb, 3Mb, 2Mb, 1Mb, 0.5Mb, 100kb, 50kb, 35kb, 30kb, 20kb, o menos (como se describió anteriormente) y que comprenden el locus cyv\_3.1 o una variante del mismo. En un aspecto, la parte tiene al menos 5kb, 10kb, 20kb de tamaño o más.

25 En otro aspecto adicional, el fragmento de introgresión de la invención (que comprende cyv\_3.1 o una variante del mismo y en el que el fragmento de introgresión es introgressado de una planta silvestre de sandía) comprende la región que comienza en 7.50 Mb y termina en 7.75Mb del cromosoma 3, o la región que comienza en 7.60 Mb y termina en 7.70 Mb, en donde el fragmento comprende el locus cyv\_3.1 o una variante del mismo. En un aspecto, la parte tiene al menos 5kb, 10kb, 20kb de tamaño o más.

30 También se proporcionan aquí semillas a partir de las cuales se pueden cultivar las plantas de la invención.

Asimismo, las partes vegetales de las plantas de la invención se incluyen aquí, tales como células, raíces, hojas, frutos, partes de frutas, polen, óvulos, flores, portainjertos, vástagos, esquejes, tallos, ADN extraído de tales partes o células, etc. Dichas partes de plantas

comprenden en su genoma al menos un cromosoma 3 recombinante que comprende el fragmento de introgresión, detectable por uno o más marcadores como se describe. Asimismo, el ADN genómico extraído de tales células o partes de plantas comprende en su genoma al menos un cromosoma 3 recombinante que comprende el fragmento de  
5 introgresión, detectable por uno o más marcadores como se describe.

La fuente de resistencia al CVYV *C. lanatus* ssp. *mucosospermus* fue un acceso silvestre obtenido de la colección GRIN de los Estados Unidos. Tiene frutos pequeños (aproximadamente 13 cm x 13 cm) de pulpa blanca con un brix de aproximadamente 3.0. El acceso de *C. lanatus* ssp. *lanatus* también fue un acceso silvestre obtenida de la  
10 colección GRIN de los Estados Unidos. Tenía frutos amargos amarillos de unos 16 cm x 24 cm, con un brix por debajo de 3.0.

La *cyv\_3.1* de resistencia se retrocruzó desde estas dos accesos silvestres diploides a líneas de élite de sandía susceptibles a CVYV, generando así sandía diploide cultivada que comprende *cyv\_3.1* y que es resistente contra CVYV, cuando el fragmento de introgresión  
15 estaba presente en forma homocigota.

Como se mencionó anteriormente, las semillas de dos líneas de sandía cultivadas endógamas diploides que comprenden *cyv\_3.1* en forma homocigota se han depositado en el NCIMB bajo los números de acceso NCIMB42449 y NCIMB42450. Estas dos líneas comprenden SNP\_02 y SNP\_03 en forma homocigota y tienen el haplotipo B del SNP. Los  
20 frutos son frutos de pulpa roja, con semillas, que tienen un brix de 11.0 y, por lo tanto, son frutos comercializables. Las plantas son resistentes a CVYV pero susceptibles a ZYMV (y también carecen del marcador *elF4E* de Ling et al., 2008 supra). Una de las líneas tiene frutas con corteza dulce Crimson, la otra tiene frutas con corteza de Jubilee. El *cyv\_3.1* puede transferirse desde estas dos líneas a cualquier otra línea o variedad de sandía  
25 cultivada mediante selección tradicional, utilizando la selección fenotípica o la selección de marcadores, o ambas.

También las semillas de otra línea endogámica elite diploide que comprende *cyv\_3.1* en forma homocigota han sido depositadas por Nunhems BV en el NCIMB bajo el número de acceso NCIMB 42666. Esta línea comprende SNP\_02 y SNP\_03 en forma homocigota y  
30 tiene el haplotipo A SNP. Los frutos son frutos de pulpa roja con semilla. Las plantas son resistentes al CVYV.

En un aspecto, el *cyv\_3.1* se puede obtener a partir de (puede obtenerse de/es como está presente en) semillas depositadas bajo NCIMB42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666, por ejemplo, cruzando plantas cultivadas a partir de tales semillas (o progenie de las mismas)

con otra planta de sandía y seleccionando la progenie que comprende el fragmento de introgresión. En un aspecto, la otra planta de sandía es una sandía cultivada que carece de cyv\_3.1.

Alternativamente, otros accesos silvestres de *C. lanatus* ssp. *mucosospermus* o de *C. lanatus* ssp. *lanatus* puede comprender cyv\_3.1 (o una variante del mismo) y puede usarse para introgresar cyv\_3.1 (o una variante del mismo) en sandía cultivada. Para identificar tales otros accesos silvestres, se pueden usar uno o más de los marcadores proporcionados en este documento, opcionalmente en combinación con ensayos de resistencia al CVYV. Por ejemplo, se descubrió que las semillas del acceso de sandía silvestre PI189318, comprenden cyv\_3.1, como se muestra en el Ejemplo 6, cuando se criba la progenie de acceso de sandía silvestre de la colección GRIN de los Estados Unidos. Utilizando los marcadores de SNP proporcionados aquí. PI189318 produce frutas duras de pulpa blanca, que son amargas y tienen un brix muy bajo (alrededor de 3.0). El locus cyv\_3.1 puede introgresarse a partir de esta, u otros accesos de sandía silvestre, en sandía cultivada como se describe en la presente memoria, opcionalmente usando uno o más de los marcadores de SNP proporcionados aquí. Por lo tanto, en un aspecto, la planta de sandía cultivada de la invención comprende un fragmento de introgresión de, por ejemplo, PI189318 o progenie de la misma, o de otras sandías silvestres, donde el fragmento de introgresión comprende el locus de resistencia cyv\_3.1 y es detectable por uno o más marcadores ligados a cyv\_3.1 como se describe en este documento. Las sandías silvestres pueden ser del haplotipo A o B de SNP. Por ejemplo, PI189318 tiene el haplotipo A SNP en forma homocigota.

En una realización de la invención (semilla de) una planta de sandía cultivada diploide de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*, se proporciona en donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3, donde dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia al CVYV, por lo que dicho fragmento de introgresión comprende:

- a) una guanina (G) en el nucleótido 7.664.093 del cromosoma 3 del genoma de sandía cultivada (SNP\_02); y/o
- b) una citosina (C) en el nucleótido 7.693.225 del cromosoma 3 del genoma de sandía cultivada (SNP\_03); y/u opcionalmente
- c) un marcador molecular específico del genoma de sandía silvestre dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20 kb, 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03.

En otra realización de la invención (semilla de) una planta de sandía cultivada diploide de la especie *Citrullus lanatus ssp vulgaris*, se proporciona donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta silvestre de sandía en el cromosoma 3, donde dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia CVYV y por el cual dicho fragmento de introgresión es detectable por (o comprende) un marcador seleccionado del grupo que consiste de:

- a) una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la SEQ ID NO: 2; y/o
- b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o una molécula de ácido nucleico que se hibrida en condiciones rigurosas con la SEQ ID NO: 3; y/u opcionalmente
- c) un marcador molecular específico del genoma de sandía silvestre dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20 kb, 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03.

En una realización diferente de la invención (semilla de) una planta de sandía cultivada diploide de la especie *Citrullus lanatus ssp vulgaris*. se proporciona, donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta silvestre de sandía en el cromosoma 3, donde dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia al CVYV y por el cual dicho fragmento de introgresión es detectable por (o comprende) un marcador seleccionado del grupo que consiste de:

- a) una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
- b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y/u opcionalmente
- c) un marcador molecular específico del genoma de sandía silvestre dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20 kb, 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03.

En un aspecto, el fragmento de introgresión y los marcadores son homocigotos.

En un aspecto, las plantas de la invención carecen de un locus que confiere resistencia a ZYMV en el cromosoma 3. Sin embargo, la resistencia al CVYV también se puede combinar con la resistencia al ZYMV en el cromosoma 3 como se describe a continuación.

5 También partes de plantas, tales como frutas o partes de ellas, células, hojas, flores, etc. de las plantas anteriores se incluyen aquí. Como se mencionó anteriormente, las frutas son frutos diploides comercializables.

En una realización, la planta de sandía cultivada o la parte de planta que comprende el locus que confiere resistencia CVYV como se encuentra en las semillas depositadas con los números de acceso NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666 o como se  
10 encuentra en la sandía silvestre PI 189318 u otras sandías silvestres. Así, en un aspecto, cyv\_3.1 es obtenible (puede obtenerse) cruzando una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB42449 o NCIMB42450 o NCIMB42666, o la progenie de cualquiera de estas plantas (por ejemplo, obtenida por autofecundación y/o cruce y cuya progenie retiene el cyv\_3.1), con otra planta de sandía, por ejemplo una línea  
15 o variedad elite de sandía cultivada. En otro aspecto, el gen cyv\_3.1 se puede obtener mediante la introgresión de la resistencia de las sandías silvestres, tales como PI189318 u otras sandías silvestres, a la sandía cultivada.

En otro aspecto, la planta o parte de planta de sandía cultivada que comprende el fragmento de introgresión que confiere resistencia CVYV como se encuentra en las  
20 semillas depositadas con los números de acceso NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666, o una parte más corta de la misma, que retiene cyv\_3.1. Así, en un aspecto, el fragmento de introgresión que comprende cyv\_3.1 es obtenible (puede obtenerse al) cruzar una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB42449 o NCIMB42450 o NCIMB42666, o la progenie de cualquiera de estas plantas (por ejemplo,  
25 obtenidas por autofecundación) y/o cruce y cuya progenie retiene el cyv\_3.1), con otra planta de sandía.

Por lo tanto, el gen de resistencia CVYV en el cromosoma 3 es en un aspecto el gen presente en las semillas depositadas bajo el Número de Acceso NCIMB42449 o NCIMB42450 o NCIMB42666, o su progenie, pero también puede ser igualmente el gen de  
30 resistencia de otra sandía silvestre, especialmente una sandía silvestre que comprende uno o más de los marcadores de SNP, es decir, el genotipo de resistencia de los marcadores de SNP, unido a cyv\_3.1. Los ejemplos son accesos silvestres como PI189318 u otros. Además del análisis de marcador o como una alternativa, por ejemplo, el experto puede llevar a cabo fácilmente una prueba de alelismo para determinar si dicha resistencia  
35 CVYV es conferida por el mismo gen de resistencia, concretamente cyv\_3.1. Del mismo

modo, se pueden usar otros métodos o combinaciones de métodos, tales como mapeo, mapeo fino, secuenciación, herencia genética y similares para confirmar que el mismo gen, cyv\_3.1, es responsable del fenotipo de resistencia CVYV.

Combinar cyv\_3.1 que confiere resistencia al CVYV con resistencia al ZYMV

5 Los inventores encontraron que cyv\_3.1 está ubicado en el mismo cromosoma que el gen zym recesivo, que confiere resistencia contra ZYMV. Por lo tanto, cyv\_3.1 se puede combinar con zym en el cromosoma 3 para proporcionar un cromosoma que comprende loci que confieren resistencia al CVYV y a ZYMV en la fase de acoplamiento.

10 ZYMV es un virus transmitido por áfidos y puede causar deformación y decoloración de frutos de levas a severos.

Las fuentes para la resistencia a zym son, por ejemplo, PI595203 como se describe por Ling et al. 2008 (supra). Los inventores han convertido el marcador CAPS descrito por Ling et al. 2008 en un marcador de SNP denominado SNP\_04, consulte la Tabla 2.

15 Tabla 2 - Marcador de SNP en el gen eIF4E ligado a la resistencia al ZYMV y localización de SNP en el cromosoma 3 del genoma de sandía cultivada publicado en la world wide webred mundial [icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi](http://icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi), "Watermelon: Genome", "Watermelon genome (97103) - version 1"

Nombre del marcador SNP	Sandái con introgresión zym/zym de por ej. PI595203	Variedad de sandía sin zym/zym	Secuencia genómica (dirección 5' a 3') que comprende el SNP en el at nucleótido 70 de la secuencia, y localización física en el cromosoma 3 (*) de sandía cultivada
SNP_04	GG	TT	TGAAGTTCTACCTCCAAAAC TCCTCAACAGTAGAGAAGGT ATAGATCGGTCGGATAGACG CACCCCAGG[G/T]*GGCTT GCTTAGACTTGGCGGATGGG TTATCGAACCAAAAGGTCCA AGAGTGCTCAAGAGGGTGAG GCTGATGCACTATCGCCGCC GACAAATTGGACGAGTCAAG GTCGTCGTCTCCGACGATCT CTCCTTCCTCAAGTTCCTCA TCTTCATCACCGCCTCGTCC TCTAGGGTTTTGATTTGCAA TGGTATTAGAAAGATCTTCC

			GTGGATGTAGCTTTGATCGT CTCTTCGACTACCATTTTCC TTTCACTACTTGTGGAATTG AGCGT (SEQ ID NO: 4) *Localizado en el nucleótido 7.767.975
Fenotipo	Resistente al ZYMV	Susceptible a ZYMV	

Las plantas de sandía diploide de la invención descrita anteriormente pueden, por lo tanto, comprender adicionalmente el gen zym en el cromosoma 3.

Por lo tanto, en un aspecto de la invención (semilla de) una planta de sandía cultivada diploide de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *Vulgaris* se proporciona, donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta silvestre de sandía en el cromosoma 3 que comprende un locus que confiere resistencia al CVYV, por lo que dicho fragmento de introgresión es detectable por (o comprende) un marcador seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 a) una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID N°: 2 (SNP\_02) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y / o
- b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y / o
- 15 c) un marcador molecular específico del genoma de sandía silvestre dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03; y
- d) en donde la planta comprende adicionalmente el gen zym en el cromosoma 3.
- 20 Opcionalmente, la presencia de (un fragmento de introgresión que comprende) el gen zym es mediante la detección de una guanina (G) en el nucleótido 70 de la SEQ ID NO: 4 (SNP\_04) o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4. Sin embargo, SNP\_04 probablemente no está muy relacionado con zym, por lo que la selección

fenotípica o el desarrollo de un un marcador más estrechamente vinculado puede ser preferido para asegurar que zym esté presente.

El cromosoma 3 recombinante, por lo tanto, comprende el fragmento de introgresión que comprende el locus de resistencia al CVYV cyv\_3.1 y puede comprender además (un  
5 fragmento de introgresión que comprende) el gen zym en el mismo cromosoma. La planta no necesita ser fenotípicamente resistente al CVYV y resistente al ZYMV, ya que el locus de resistencia al CVYV y el gen zym pueden estar en forma heterocigota (solo puede estar presente un cromosoma 3 recombinante). En un aspecto, la planta es homocigota para el cromosoma 3 recombinante y, por lo tanto, es resistente tanto contra el CVYV como contra  
10 ZYMV.

Así, en un aspecto, el fragmento de introgresión que comprende el locus de resistencia al CVYV cyv\_3.1 está en forma homocigota, y el gen zym (fragmento de introgresión que comprende) está en forma homocigota, por lo que la planta es resistente al CVYV y ZYMV. En un aspecto, el (los) marcador(s) específico(s) del genoma de sandía silvestre ligado a cyv\_3.1 son homocigóticos y zym es homocigótico (zym/zym), y opcionalmente SNP\_04  
15 (si está presente) es homocigoto GG (Guanina)/Guanine).

En una realización específica de la invención (semilla de) una planta de sandía cultivada diploide de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris* se proporciona, donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3 que comprende un locus que confiere resistencia al CVYV denominado cyv\_3.1, por lo que dicho fragmento de introgresión es detectable por (o comprende):  
20

- a) una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y
- 25 b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y
- c) en donde el cromosoma 3 comprende adicionalmente el gen zym.

En un aspecto, la planta comprende el fragmento de introgresión en el cromosoma 3 en forma homocigota, es decir, el fragmento de introgresión es detectable por (o comprende):  
30

- a) un genotipo diploide GG (Guanina/Guanina) para el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96% , 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;  
y

b) un genotipo diploide CC (citosina/citosina) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,  
5 95%, 96% , 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y

c) en donde el cromosoma 3 comprende además el gen zym en forma homocigota (zym/zym); y

d) en donde la planta es resistente al CVYV y ZYMV.

Las plantas diploides anteriores pueden tener, en una realización, un haplotipo A de SNP  
10 en CVYV o un haplotipo B de SNP combinados con el gen zym. Por lo tanto, en un aspecto, las plantas comprenden el haplotipo A SNP que tiene GGC para SNP\_01 y SNP\_02 y SNP\_03, respectivamente (por ejemplo, en forma diploide, el haplotipo A del SNP es GG-GG-CC en forma homocigota o GG-GA-CT en forma heterocigota) y el gen zym ligado en el mismo cromosoma como cyv\_3.1 (y opcionalmente SNP\_04 tiene el genotipo diploide  
15 GT, heterocigoto o GG, homocigoto). En otro aspecto, la planta comprende el haplotipo B de SNP que tiene AGC para SNP\_01 y SNP\_02 y SNP\_03, respectivamente (por ejemplo, en forma diploide, el haplotipo A del SNP es AA-GG-CC en forma homocigota o AG-GA-CT en forma heterocigota) y el el gen zym ligado en el mismo cromosoma como cyv\_3.1 (y opcionalmente SNP\_04 tiene el genotipo diploide GT, heterocigoto GG, homocigoto). Por  
20 lo tanto, en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 1 (SNP\_01) o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, el genotipo de SNP puede ser una Guanina o una Adenina. SNP\_01 puede distinguir los dos diferentes haplotipos de resistencia al CVYV, pero cualquier haplotipo puede combinarse con el gen zym en el mismo cromosoma 3.

25 Una planta diploide resistente al CVYV y ZYMV puede, por lo tanto, comprender uno de los siguientes dos genotipos:

Marcador SNP y gen en el cromosoma 3 3	Genotipo SNP diploide	Genotipo SNP diploide
SNP_01	GG	AA
SNP_02	GG	GG
SNP_03	CC	CC
gen	zym/zym	zym/zym

Opcionalmente SNP_04	GG	GG
----------------------	----	----

5 Para combinar el locus de resistencia al CVYV cyv\_3.1 con el gen zym, la persona experta cruzará una planta de la invención, que comprende cyv\_3.1, con una planta que comprende el gen zym y selecciona una planta de progenie recombinante que comprende el locus cyv\_3.1 del CVYV y el gen zym en un cromosoma 3 recombinante.

En una realización, la planta o parte de planta de sandía cultivada que comprende el locus cyv\_3.1 que confiere resistencia al CVYV como se encuentra en las semillas depositadas con los números de acceso NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666 y además comprende el gen zym.

10 En una realización, la planta o parte de planta de sandía cultivada que comprende el fragmento de introgresión (que comprende cyv\_3.1) como se encuentra en semillas depositadas con los números de acceso NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666, o un fragmento más pequeño de la misma (que retiene el locus cyv\_3.1) y además comprende el gen zym.

15 En un aspecto, las plantas de sandía diploide (y las semillas a partir de las cuales se pueden cultivar las plantas) de acuerdo con la invención son líneas endogámicas, producidas por autofecundación varias veces.

20 En otro aspecto, las plantas de sandía diploide (y las semillas a partir de las cuales se pueden cultivar las plantas) de acuerdo con la invención son híbridos F1 producidos cruzando dos líneas endogámicas diploides de acuerdo con la invención y recogiendo las semillas del cruce.

Las plantas cultivadas a partir de las semillas depositadas también se analizaron para determinar la resistencia a CGMMV (virus verde haspeado del pepino), pero eran susceptibles, lo que indica que cyv\_3.1 no confiere resistencia a CGMMV.

25 Plantas de sandía cultivadas tetraploides, y partes de plantas, que comprenden cyv 3.1 (o una variante del mismo)

30 La producción de sandía triploide sin semilla implica el uso de polen de plantas progenitoras machos diploides para fertilizar las flores de plantas parentales maternas tetraploides ( $2n = 4x = 44$ ). La polinización de las flores tetraploides con polen diploide conduce a semillas F1 que son triploides (Kihara, 1951, Proceedings of American Society for Horticultural Science 58: 217-230, Eigsti 1971, Hort Science 6: 1-2). Las plantas híbridas triploides,

cultivadas a partir de estas semillas F1, son autoinfértiles ya que producen polen estéril debido al desequilibrio cromosómico (Fehr, 1987). Los híbridos triploides, por lo tanto, necesitan ser polinizados por un polinizador diploide para producir fruta de sandía. Por lo tanto, las plantas triploides se intercalan con plantas polinizadoras para la producción de  
5 fruta. La fruta “sin semillas” producida después de la polinización en la planta híbrida triploide a menudo no es realmente sin semillas, pero puede contener algunas semillas pequeñas, pálidas, no desarrolladas, que son comestibles.

Por lo tanto, para producir tales variedades triploides sin semillas, se cruza una línea parental hembra tetraploide (preferiblemente una línea endogámica) y una línea parental  
10 macho diploide (preferiblemente una línea endogámica). Las semillas producidas en los frutos del progenitor tetraploide mediante polinización cruzada son triploides, que tienen dos conjuntos de cromosomas de la madre tetraploide y un conjunto de cromosomas del padre diploide. Estas semillas se cosechan y se venden como variedades triploides. Las plantas triploides cultivadas a partir de estas semillas todavía necesitan polen para inducir  
15 la fruta (proporcionado por un polinizador), pero las frutas producidas son frutos de sandía sin semillas.

En un aspecto, se proporciona una planta de sandía tetraploide que comprende cuatro cromosomas 3 recombinantes, es decir, cada uno comprende el fragmento de introgresión de una sandía silvestre que comprende cyv\_3.1. Por lo tanto, la planta tetraploide  
20 comprende cuatro copias de cyv\_3.1. Cuando se cruza con una línea parental macho diploide que comprende dos copias de cyv\_3.1, las semillas triploides resultantes comprenden tres copias de cyv\_3.1.

Para fabricar una planta tetraploide de este tipo, cualquiera de las plantas diploides resistentes a CVYV descritas anteriormente, que son homocigotas para el fragmento de  
25 introgresión, se puede usar como material de partida para generar plantas tetraploides. Las técnicas de duplicación de cromosomas conocidas por el experto en la técnica se pueden usar para generar una planta tetraploide a partir de tales plantas diploides. Por ejemplo, Noh et al. (2012) Hort. Reinar. Biotechnol. 53(6): 521-529, evaluaron diferentes métodos para generar sandías tetraploides. En todos los métodos, se usa un agente antimitótico,  
30 como colchicina, dinitoalanina u orizalina, para inducir la duplicación del cromosoma. Opcionalmente, se puede usar cultivo tisular para generar plantas tetraploides a partir de partes de plantas. Para verificar que las plantas son tetraploides, se puede confirmar el número de cromosomas. La ploidía se puede determinar fácilmente mediante recuento de cromosomas o citometría de flujo u otros métodos conocidos (Sari et al., 1999, Scientia  
35 Horticulturae 82: 265-287, incorporada aquí como referencia).

Por lo tanto, en un aspecto de la invención (semilla de) una planta de sandía cultivada tetraploide resistente al CVYV de la especie *Citrullus lanatus ssp vulgaris*. se proporciona, donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta silvestre de sandía en el cromosoma 3, por lo que dicho fragmento de introgresión confiere resistencia CVYV debido a la presencia del locus *cyv\_3.1* y por lo que el cromosoma 3 recombinante está presente en cuatro copias.

El fragmento de introgresión es detectable por (o comprende) un marcador seleccionado del grupo que consiste en:

- 10 a) una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
- b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y/o
- 15 c) un marcador molecular específico del genoma de sandía silvestre dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20 kb, 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03.

Como se mencionó, la planta tetraploide comprende cuatro copias de dicho cromosoma 3 recombinante.

20 Por lo tanto, en una realización, la planta de sandía tetraploide anterior comprende:

- a) un genotipo tetraploide GGGG (guanina/guanina/guanina/guanina) para nucleótidos 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
- 25 b) un genotipo tetraploide CCCC (citosina/citosina/citosina/citosina) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y/o
- c) un genotipo tetraploide para el marcador molecular sandía-genoma específico silvestre dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20 kb, 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03.
- 30

La genotipificación de plantas tetraploides o partes de plantas (células, hojas, ADN, etc.) se puede hacer de la misma manera que para diploides, usando, por ejemplo, un ensayo KASP para distinguir genotipos de SNP, por ejemplo, las plantas o partes que comprenden GGGG para SNP\_02 se pueden distinguir de plantas o partes que comprenden GGGA, GGAA, GAAA o AAAA para SNP\_02 en su genoma.

5

Como el tetraploide se obtiene duplicando los cromosomas de un diploide resistente al CVYV descrito anteriormente, los aspectos descritos para el diploide anterior también se aplican al tetraploide. Por ejemplo, el tetraploide también puede comprender el gen zym en fase de acoplamiento en el cromosoma 3 recombinante y, por lo tanto, puede comprender cuatro copias de cyv\_3.1 (o una variante del mismo) y cuatro copias de zym. Del mismo modo, el haplotipo A o el haplotipo B pueden estar presentes en cuatro copias.

10

Entonces, de los diploides anteriores se pueden derivar los siguientes tetraploides:

Marcador SNP y gen en el cromosoma 3	Genotipo SNP diploide → genotipo SNP tetraploide	Genotipo SNP diploide → genotipo SNP tetraploide
SNP_01	GG → GGGG	AA → AAAA
SNP_02	GG → GGGG	GG → GGGG
SNP_03	CC → CCCC	CC → CCCC
Opcionalmente gen zym	zym/zym → zym/zym/zym/zym	zym/zym → zym/zym/zym/zym
Opcionalmente SNP_04	GG → GGGG	GG → GGGG

El tetraploide resistente al CVYV preferiblemente se autofecunda varias veces, para producir un tetraploide endogámico, que puede usarse como progenitor hembra en la producción de semillas triploides.

15

En un aspecto, las plantas diploides resistentes a CVYV cuyas semillas se depositaron con los números de acceso NCIMB 42449 y NCIMB 42450, o progenie de las mismas (por ejemplo, que comprenden un fragmento de introgresión más pequeño) se usan para preparar tetraploides. Estas plantas no comprenden el gen zym y son susceptibles a ZYMV.

20

En un aspecto, las plantas diploides resistentes a CVYV cuyas semillas se depositaron con los números de acceso NCIMB 42666, o progenie de las mismas (por ejemplo, que comprenden un fragmento de introgresión más pequeño) se usan para preparar tetraploides.

En otro aspecto, se usan plantas de sandía cultivadas que comprenden un gen *cyv\_3.1* de una sandía silvestre diferente, tal como de PI189318 u otras, para preparar una planta tetraploide resistente al CVYV.

5 Además, las plantas que comprenden tanto *cyv\_3.1* (o una variante) como el gen *zym* se pueden usar para preparar tetraploides. El *cyv\_3.1* (o una variante del mismo) se puede combinar fácilmente con el gen *zym*, como por ejemplo, el encontrado en PI595203, mediante técnicas de reproducción tradicionales y selección de recombinantes, opcionalmente con la ayuda de marcadores descritos en este documento, que comprende tanto *cyv\_3.1* como *zym* en el cromosoma 3. PI595203 está disponible en USDA, ARS,  
10 Programa Nacional de Recursos Genéticos, Red de Información de Recursos de Germoplasma - (GRIN).

Por lo tanto, en un aspecto se proporciona aquí una planta de sandía tetraploide (y semilla a partir de la cual se puede cultivar la planta) que comprende el locus que confiere resistencia al CVYV como se encuentra en NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666  
15 o en PI189318 u otras sandías silvestres y opcionalmente que comprende el gen *zym*.

En un aspecto, las plantas de sandía tetraploide (y las semillas a partir de las cuales se pueden cultivar las plantas) de acuerdo con la invención son líneas endogámicas, producidas por autofecundación varias veces. En un aspecto, las plantas son adecuadas como líneas parentales para la producción de semilla triploide, que se describe a  
20 continuación.

Las semillas a partir de las cuales se pueden cultivar tales plantas tetraploides están incluidas aquí. También se incluyen aquí partes de plantas de las plantas tetraploides de acuerdo con la invención, tales como células, polen, flores, frutos, hojas, tallos, etc. Las frutas son preferiblemente frutas comercializables. El brix es preferiblemente al menos 6.0,  
25 7.0, 8.0 al menos 9.0, preferiblemente al menos 10.0, más preferiblemente al menos 11.0 o más. El color de la fruta puede ser de cualquier color, como rojo, rojo oscuro, rojo escarlata, rojo coral, naranja, salmón, rosa, rojo rosáceo, amarillo, amarillo canario o blanco. Preferiblemente, el color de la pulpa de la fruta es uniforme.

En un aspecto, la planta tetraploide de la invención es una propagación vegetativa.

30 Las plantas tetraploides pueden autofecundarse una o más veces, pero también se pueden cruzar a otra planta de sandía tetraploide. Si esa otra planta de sandía tetraploide carece de *cyv\_3.1*, la F1 producida por el cruce contiene solo dos copias de *cyv\_3.1*. Si una planta de este tipo se cruza de nuevo con una planta tetraploide que carece de *cyv\_3.1*, se puede generar una progenie con solo una copia de *cyv\_3.1*. De manera similar, si dicha planta es

autofecundada, se puede generar una progenie con una o tres copias de cyv\_3.1. Por lo tanto, una sandía tetraploide que comprende 3, 2 o solo 1 copia de cyv\_3.1 también se incluye aquí.

Plantas triploides cultivadas de sandía, y partes de plantas, que comprenden cyv 3.1 (o una variante del mismo)

5

En un aspecto, la planta tetraploide resistente al CVYV descrita anteriormente se usa como progenitor femenino y se poliniza con polen de un progenitor macho diploide resistente al CVYV (también como se describió anteriormente) y se recogen las semillas del cruce. Estas semillas son triploides, es decir, comprenden tres copias del locus cyv\_3.1 de la invención. Las plantas cultivadas a partir de estas semillas son resistentes al CVYV y producen frutos de sandía sin semillas (frutos triploides). Opcionalmente, las plantas también son resistentes a ZYMV, es decir, comprenden el gen zym.

10

Por lo tanto, todos los aspectos descritos anteriormente para las plantas diploides y tetraploides de la invención se aplican a las semillas triploides y a las plantas cultivadas a partir de tales semillas. Entonces, por ejemplo, en un aspecto, el locus cyv\_3.1 es el locus cyv\_3.1 que se encuentra en las semillas depositadas bajo NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666. Pero también puede ser el gen cyv\_3.1 encontrado en las sandías silvestres, tales como PI189318 u otros. En otro aspecto, el fragmento de introgresión (que comprende el locus cyv\_3.1) encontrado en las semillas depositadas bajo NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666 está abarcado aquí, o un fragmento más pequeño del mismo, cuyo fragmento más pequeño retiene el locus cyv\_3.1. Pero también están comprendidas otras variantes de cyv\_3.1 aquí, por ejemplo, de otros accesos de sandía silvestre.

15

20

Las semillas a partir de las cuales pueden cultivarse plantas triploides resistentes a CVYV son una realización en la presente memoria, al igual que las partes de plantas cultivadas a partir de tales semillas, así como las frutas de sandía sin semillas producidas por estas plantas.

25

Las frutas triploides sin semillas son preferiblemente comercializables. Preferiblemente tienen un brix promedio de al menos 6.0, 7.0, 8.0 o preferiblemente al menos 9.0, preferiblemente al menos 10.0, más preferiblemente al menos 11.0.

30

Las frutas pueden ser de cualquier tamaño, forma, color y patrón de corteza. Preferiblemente, el color de la pulpa de la fruta en la madurez es uniforme. En un aspecto, la pulpa de la fruta es roja o de color rojo oscuro.

El peso medio del fruto de un híbrido triploide que comprende cyv\_3.1 (o una variante del mismo) en tres copias puede ser igual o superior a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 kg. En otra realización, el peso medio de fruta de un híbrido triploide que comprende cyv\_3.1 (o una variante del mismo) en tres copias puede ser igual o inferior a 5 kg, por ejemplo 4, 3, 2, 1.5 o 1 kg o incluso menos.

Los frutos sin semillas pueden ser de cualquier forma (por ejemplo alargada, ovalada, compacta, esférica o redonda), superficie de la fruta (surcada, lisa), color pulpa (rojo, rojo oscuro, rojo escarlata, rojo coral, naranja, salmón, rosa, rojo rosado, amarillo, amarillo canario o blanco), color de la corteza (por ejemplo, verde claro; verde oscuro; rayas verdes con rayas angostas, medianas o anchas; tipos grises; con o sin manchas; amarillo dorado), grosor de la corteza, dureza de la corteza, patrón de corteza (por ejemplo, rayado, sin rayas, enmallado), estructura de la pulpa/firmeza de la pulpa, contenido de licopeno y/o vitamina, diferentes proporciones de azúcar a ácido, sabor a fruta, etc.

Por lo tanto, la resistencia al CVYV que confiere el locus cyv\_3.1 (o variante) se puede utilizar para reproducir una gama de variedades sin semillas, produciendo frutos de diferentes formas y tamaños, etc. mediante el cultivo tradicional. Ver Guner y Wehner 2004, Hort Science 39(6): 1175-1182, en particular páginas 1180-1181 que describen los genes de las características de la fruta. Los principales objetivos de cultivo son: madurez temprana, alto rendimiento de fruto, alta calidad interna del fruto (buen color uniforme, alto contenido de azúcar, proporción adecuada de azúcar: ácido, buen sabor, alto contenido de vitaminas y licopeno, textura de pulpa firme, textura de pulpa no fibrosa, libertad de defectos tales como corazón hueco, necrosis de la corteza, pudrición del extremo de la flor o punto de cruz y buenas características de la corteza y resistencia al agrietamiento).

En un aspecto, la planta triploide de la invención es una propagación vegetativa.

#### 25 Propagaciones vegetativas y cultivos celulares o tisulares

Las plantas diploides anteriores, plantas tetraploides o plantas triploides también se pueden reproducir vegetativamente (clonalmente) y tales plantas propagadas vegetativamente, o “propagaciones vegetativas” son una realización de la invención. Pueden distinguirse fácilmente de otras plantas de sandía por uno o más (o todos) de los marcadores relacionados con cyv\_3.1 (o una variante del mismo) y/o fenotípicamente.

Las propagaciones vegetativas se pueden hacer por diferentes métodos. Por ejemplo, uno o más vástagos de una planta de la invención pueden injertarse en un portainjertos diferente, por ejemplo un portainjertos tolerante al estrés biótico o abiótico.

Otros métodos incluyen métodos de cultivo de células o tejidos in vitro y la regeneración de propagaciones vegetativas de dichos cultivos. Tales cultivos celulares o tisulares comprenden o consisten en diversas células o tejidos. En un aspecto, dicho cultivo de células o tejidos comprende o consiste en células vegetativas o tejidos vegetativos.

- 5 En otro aspecto, un cultivo celular o tisular comprende o consiste en células o tejidos reproductivos, tales como anteras u óvulos. Dichos cultivos se pueden tratar con agentes de duplicación de cromosomas para hacer, por ejemplo, plantas haploides dobles, o pueden usarse alternativamente para hacer plantas haploides (por ejemplo, para formar diploides a partir de un tetraploide o para formar haploides a partir de un diploide).
- 10 Un cultivo celular o tisular in vitro puede, por lo tanto, comprender o consistir en células o protoplastos o tejido vegetal de una parte de la planta seleccionada del grupo que consiste en: fruta, embrión, meristema, cotiledón, polen, óvulo, hoja, antera, raíz, punta de la raíz, pistilo, flor, semilla, tallo. También se incluyen partes de cualquiera de estos, como por ejemplo solo el recubrimiento de la semilla (tejido materno).
- 15 Por lo tanto, en un aspecto de la invención, se proporciona un cultivo celular o un cultivo tisular de células de una planta que comprende una, dos, tres o cuatro copias de cyv\_3.1 (o una variante), todo como se describió anteriormente. Como se mencionó, un cultivo celular o un cultivo tisular comprende células o protoplastos o tejido vegetal de una parte de la planta de una planta que comprende cyv\_3.1 puede comprender o consistir en células
- 20 o tejidos seleccionados del grupo que consiste en: embrión, meristema, cotiledón, polen, hoja, antera, raíz, punta de la raíz, pistilo, flor, semilla, tallo; o partes de cualquiera de estos.

También se proporciona una planta de sandía regenerada a partir de dicho cultivo celular o cultivo tisular, donde la planta regenerada (o progenie de la misma, por ejemplo obtenida después de autofecundar la planta regenerada) comprende el locus cyv\_3.1 (o una variante

25 del mismo). Por lo tanto, en un aspecto, la planta de sandía que comprende cyv\_3.1 (o una variante de la misma) en una o más copias es una planta de sandía de propagación vegetativa.

En un aspecto diferente, las células y tejidos de la invención (y opcionalmente también el cultivo celular o tisular), que comprende cyv\_3.1 (o una variante del mismo) en una o más

30 copias, son células o tejidos que no se propagan.

*Métodos y usos de QTL cyv 3.1 (o una variante) y/o de marcadores ligados a cyv 3.1 (o a una variante del mismo)*

El locus *cyv\_3.1* recesivo de la invención (o una variante del mismo), es decir, el fragmento de introgresión que comprende el locus, se puede transferir a, o introducir en, cualquier otra planta de sandía cultivada, por ejemplo, hacer cruces con las plantas de la invención, por ejemplo, plantas cultivadas a partir de las semillas depositadas, o con plantas de la  
5 invención propagadas vegetativamente, o identificando plantas de sandía silvestre que comprenden el *cyv\_3.1* (o una variante del mismo) e introgresar *cyv\_3.1* (o una variante del mismo) a partir de tal acceso silvestre a sandía cultivada como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, los accesos silvestres de sandía se pueden seleccionar con uno o más  
10 marcadores vinculados al locus *cyv\_3.1* (por ejemplo, SNP\_02 y/o SNP\_03 y/o uno o más marcadores diferentes ligados a *cyv\_3.1*) para identificar accesos silvestres putativos que comprenden *cyv\_3.1* o una variante del mismo. Tales accesos también pueden seleccionarse opcionalmente o alternativamente fenotípicamente en un ensayo de resistencia al CVYV y/o pueden cruzarse con plantas de sandía cultivadas y los  
15 descendientes del cruce pueden seleccionarse para el genotipo marcador de resistencia al CVYV y/o fenotipo de resistencia al CVYV. El experto en la materia puede, por lo tanto, identificar el QTL *cyv\_3.1* o una variante del mismo en otros accesos de sandía silvestre, transferirlo a sandía cultivada en el cromosoma 3, por ejemplo, por retrocruzamiento 4, 5, 6, 7 o más veces a líneas de sandía cultivadas para generar plantas de sandía diploide de  
20 la invención. Estos pueden usarse luego para generar tetraploides y triploides como se describe en el presente documento.

Por lo tanto, la resistencia al CVYV conferida por *cyv\_3.1*, o una variante de la misma, se puede cruzar en diferentes fondos genéticos de sandía cultivada por ejemplo, usando  
25 semilla depositada en la presente como fuente de *cyv\_3.1*, como se describe en otra parte de este documento, o identificando el *cyv\_3.1* (o una variante del mismo) en accesos de sandía silvestre y (retro) cruzarlo en sandía cultivada.

El *cyv\_3.1* (o una variante) se puede introducir en otras plantas de sandía que carecen de *cyv\_3.1* (o una variante) utilizando métodos de cultivo conocidos. Los métodos de cultivo conocidos pueden usarse solos o en combinación, tales como (pero no limitados a) la  
30 selección recurrente, el cultivo de pedigrí, el cultivo de retrocruzamiento, el desarrollo endogámico, la prueba híbrida, el cultivo asistido por marcadores, etc. Luego se seleccionan la progenie que retienen *cyv\_3.1* (o una variante) usando uno o más de los marcadores proporcionados en el presente documento y/o resistencia al CVYV (cuando no está presente un alelo WT dominante). Por lo tanto, la selección de plantas de progenie  
35 que tienen *cyv\_3.1* (o una variante) puede realizarse mediante la selección fenotípica de la resistencia al CVYV en plantas autofecundadas una o más veces y descartando plantas

que son susceptibles al CVYV. Por ejemplo, si la progenie que segrega para la resistencia al CVYV se inocula o planta en un área infestada con CVYV, las plantas resistentes al CVYV pueden identificarse fácilmente.

5 Por lo tanto, en un aspecto, un método para generar una sandía diploide cultivada de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*. se proporciona, en el que dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3, en el que dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia al CVYV, que comprende las etapas de:

10 Cruzar una planta de sandía silvestre que comprende un locus que confiere resistencia al CVYV en el cromosoma 3 con una planta de sandía diploide cultivada y seleccionar progenie de dicho cruce que comprende un genoma de sandía cultivada y un fragmento de introgresión en el cromosoma 3 de la planta de sandía silvestre, por medio de la cual dicho fragmento introgresión comprende el locus que confiere resistencia al CVYV.

15 La presencia del locus que confiere resistencia al CVYV en la planta de sandía silvestre y/o en la progenie se puede determinar fenotípicamente usando un ensayo de resistencia al CVYV y/o a nivel molecular, detectando la presencia de uno o más de los marcadores descritos aquí ligados a *cyv\_3.1* (o una variante), por ejemplo, uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en:

- 20 a) una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
- b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y/o (opcionalmente)
- 25 c) un marcador molecular específico del genoma de sandía silvestre dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20 kb, 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03.

El fragmento de introgresión también se puede transferir a otras plantas de sandía cultivadas diploides, por ejemplo, para combinar la resistencia al CVYV con otros rasgos.

30 Por lo tanto, en otro aspecto, un método para generar una sandía cultivada diploide de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris* se proporciona, en el que dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3, en el

que dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia al CVYV, que comprende las etapas de:

5 Cruzar una planta de sandía diploide cultivada que comprende un locus que confiere resistencia al CVYV en el cromosoma 3 (como se describió anteriormente) con otra planta de sandía diploide cultivada, especialmente una planta que carece de un locus que le confiere resistencia al CVYV en el cromosoma 3, y seleccionar progenie de dicho cruce (por ejemplo, F1, F2, F3 o progenie de autofecundación adicional o progenie de retrocruzamiento) que comprenden un genoma de sandía cultivada y un fragmento de introgresión en el cromosoma 3 de la planta de sandía silvestre, por lo que dicho fragmento de introgresión comprende el locus que confiere resistencia al CVYV. La progenie también puede ser el resultado de uno o más retrocruzamientos combinados opcionalmente con una o más autofecundaciones, por ejemplo, BC1, BC1S1, BC1S2, BC2, BC2S1, BC3, etc. Nuevamente, la presencia del fragmento de introgresión en la progenie se puede determinar usando uno o más de los marcadores descritos y/o ensayos de resistencia al CVYV.

También se proporciona un método de selección para seleccionar o identificar semillas de sandía, plantas o partes de plantas o ADN de tales semillas, plantas o partes de plantas que comprende en su genoma un fragmento de introgresión en el cromosoma 3 que comprende un locus que confiere resistencia al CVYV, dicho método comprende:

20 Seleccionar semillas de sandía, plantas o partes de plantas (por ejemplo, células) o ADN de tales semillas, plantas o partes de plantas para la presencia de uno o más marcadores descritos en este documento ligado a *cyv\_3.1* (o una variante), por ejemplo, uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en:

- 25 a) una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
- b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y/o
- 30 c) un marcador molecular específico del genoma de sandía silvestre dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20 kb, 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03.

Las semillas, plantas o partes de plantas de sandía pueden ser haploides, dobles haploides, diploides, triploides o tetraploides. Obviamente, la selección para la presencia de uno o más marcadores puede implicar la selección (detección) de varias copias del marcador, por ejemplo, cuatro copias de Guanina (G) de SNP\_02 en un tetraploide. De  
 5 manera similar, alternativamente o además, la selección para la ausencia del genotipo de SNP WT (susceptible) está abarcado aquí. Entonces, cuando se refiere a una planta diploide, parte de la planta o ADN que comprende una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o en una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, el  
 10 ensayo marcador alternativamente o además puede detectar la presencia o ausencia de adenina (A) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o de una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 .

Opcionalmente, el método comprende además seleccionar una o más semillas, plantas o  
 15 partes de plantas que comprenden el fragmento de introgresión en una copia (por ejemplo, para Haploides o diploides), en dos copias (por ejemplo, para diploides o haploides dobles), en tres copias (por ejemplo, para Triploides o en cuatro copias (por ejemplo, para tetraploides).

Los marcadores moleculares descritos en este documento pueden detectarse según el  
 20 método estándar. Por ejemplo, los marcadores de SNP pueden detectarse fácilmente usando un ensayo KASP (consulte [www.kpbioscience.co.uk](http://www.kpbioscience.co.uk)) u otros ensayos de genotipificación de SNP. Para desarrollar un ensayo KASP, por ejemplo, pueden seleccionarse 70 pares de bases aguas arriba y 70 pares de bases aguas abajo del SNP y se pueden diseñar dos cebadores directos aleloespecíficos y un cebador inverso aleloespecífico. Ver por ejemplo, Allen et al. 2011, Plant Biotechnology J. 9, 1086-1099,  
 25 especialmente p097-1098 para el método de ensayo KASP.

Por lo tanto, en un aspecto, los marcadores de SNP y la presencia/ausencia del marcador asociado con cyv\_3.1 se determinan usando un ensayo KASP, pero igualmente se pueden usar otros ensayos de genotipificación de SNP. Por ejemplo, un ensayo de genotipificación  
 30 SNP TaqMan, un ensayo de fusión de alta resolución (HRM), matrices de genotipificación de SNP (por ejemplo, Fluidigm, Illumina, etc.) o la secuenciación de ADN se pueden usar igualmente.

En un aspecto diferente, un método para generar una sandía cultivada tetraploide de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris* se proporciona, en el que dicha planta comprende  
 35 un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3, donde

dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia al CVYV, que comprende las etapas de:

5 Doblar los cromosomas de una sandía diploide cultivada o parte de ella, dicho diploide es resistente al CVYV debido a la presencia de un fragmento de introgresión en el cromosoma 3 que comprende un locus que confiere resistencia al CVYV en forma homocigota, como se describe en otra parte, e identificar (o seleccionar) planta tetraploide o parte de planta y opcionalmente regenerar una planta completa a partir de la misma.

10 La planta tetraploide opcionalmente se autopoliniza una o más veces para producir una línea tetraploide endogámica, que comprende cuatro copias de *cyv\_3.1* o una variante de la misma.

Ver por ejemplo, <http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/wmelon/seedless.html> para doblar el cromosoma mediante tratamiento con colchicina e identificación tetraploide.

De nuevo, la presencia de la *cyv\_3.1* o variante de la misma se puede determinar detectando uno o más o todos los marcadores ligados.

15 Se proporciona un método para generar una planta endógama tetraploide que tiene resistencia al CVYV, que comprende los pasos de:

20 a) proporcionar una línea endogámica diploide que comprende un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3, comprendiendo dicho fragmento de introgresión un locus que confiere resistencia al CVYV, en forma homocigota, y

b) doblar los cromosomas de dicha línea endogámica o plantar parte de la línea para generar una línea tetraploide o parte de planta tetraploide y regenerar una planta tetraploide de la línea, y

c) autofecundar la línea tetraploide durante varias generaciones.

25 En la etapa a), la planta diploide puede ser cualquier planta diploide de la invención como se describió anteriormente, por ejemplo, puede ser una planta derivada de semillas depositadas bajo NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666, o progenie de cualquiera de ellas, o puede ser una planta diploide en la que se ha transferido *cyv\_3.1* del depósito de semillas NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666 mediante cruzamiento. El  
30 diploide también puede ser una nueva planta diploide generada por introgresión *cyv\_3.1* o una variante de la misma desde una sandía resistente al CVYV silvestre en sandía

cultivada. La introgresión puede ser, por ejemplo, de PI189318 u otros accesos de sandía silvestre.

En otro aspecto más, un método para generar plantas de sandía híbrida triploide de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris* se proporciona, que comprende:

- 5 Cruzar una línea parental hembra tetraploide que comprende cuatro copias de *cyv\_3.1* (o una variante de la misma) con una línea parental macho diploide que comprende dos copias de *cyv\_3.1* (o una variante de la misma) y recoger las semillas producidas en la línea parental hembra. Opcionalmente, las semillas cosechadas pueden secarse.

La polinización de la línea hembra tetraploide puede realizarse a mano o mediante insectos  
10 (por ejemplo, abejas) en bloques de aislamiento. Para asegurar la polinización de las flores hembras tetraploides con polen del diploide macho, se pueden usar diferentes métodos, tales como recolectar flores machos a mano y polinizar flores hembras, seguido de cubrir la flor polinizada. Alternativamente, todas las flores machos (estaminadas) que se desarrollan en las plantas tetraploides se pueden eliminar para asegurar la polinización de  
15 las flores pistiladas en las plantas tetraploides con polen diploide. Cuando los frutos en las plantas tetraploides son maduros, se recolectan y se recogen las semillas híbridas triploides F1 (resultantes de la polinización cruzada). Estos pueden ser luego clasificados (por ejemplo, por tamaño), secados, opcionalmente tratados, y empacados para la venta. Por lo tanto, los envases o recipientes que comprenden o consisten en semillas obtenidas  
20 por el método anterior son una realización de la presente invención.

En una realización, se proporciona un método para producir frutos triploides sin semillas, que comprende:

- a) Intercalar plantas de sandía híbrida triploide que comprenden tres copias de *cyv\_3.1* o una variante de las mismas y plantas polinizadoras diploides,
- 25 b) permitir que se produzca la polinización de las flores hembras en las plantas triploides híbridas, y, opcionalmente,
- c) cosechar los frutos de las plantas híbridas triploides.

Así, para la producción de frutos sin semillas, el híbrido triploide resistente al CVYV de acuerdo con la invención puede intercarse con un polinizador diploide adecuado, tal como  
30 por ejemplo Jenny o Polimax, o Superpolinizadores (SP-1, SP-2, SP-3, SP-4, SP-5), Sidekick, Escort-4, Companion u otros. Opcionalmente, el polinizador puede ser un polinizador de doble finalidad como se describe en el documento WO2012/069539 A1. El

5 polinizador diploide debe producir suficiente polen en el momento correcto del día y durante un período de tiempo apropiado para inducir la fructificación de frutos en híbridos triploides. Las plantas polinizadoras pueden ser diploides híbridos (diploides F1) o polinizadores de polinización abierta (OP). Los frutos se cosechan luego de las plantas triploides de la invención.

10 Las plantas triploides pueden injertarse en diferentes portainjertos. El método se lleva a cabo preferiblemente en el campo abierto. La interplantación en un campo puede realizarse mediante siembra o trasplantes del polinizador y triploides. Se pueden usar diversos métodos de interplantación, como se conoce en la técnica y se pueden usar diversas relaciones de polinizador: híbrido triploide. Una fila de plantas polinizadoras puede estar presente, por ejemplo, al menos cada 2, al menos cada 3 o al menos cada 4 filas de triploides, pero también se pueden usar otros métodos de interplantación. La polinización generalmente la realizan las abejas, y se pueden proporcionar colmenas a los campos a menos que haya suficientes abejas silvestres presentes de forma natural. La polinización también se puede realizar por medios manuales o mecánicos. La cosecha en la madurez se puede hacer a mano o mecanizada.

20 Las frutas triploides, que contienen tres copias de cyv\_3.1 (o una variante de las mismas), no tienen semillas. Los frutos se pueden cosechar para consumo en fresco o para procesamiento. Los envases que comprenden o consisten en una pluralidad de tales frutas o partes de fruta son una realización adicional de la invención. Los frutos cosechados pueden, por lo tanto, clasificarse, envasarse en recipientes, etc. Los recipientes que comprenden o consisten en frutos triploides comprenden preferiblemente o consisten en frutos comerciables, que comprenden tres copias de cyv\_3.1 (o una variante) en su genoma. También están abarcados aquí recipientes que comprenden partes de fruta y productos alimenticios o de alimentación que comprenden partes de fruta.

#### Usos según la invención

30 El uso de cyv\_3.1 (o una variante del mismo) para generar plantas de sandía cultivadas resistentes al CVYV, que producen frutos comercializables, es un aspecto de la invención. Del mismo modo, se incluye el uso de cualquiera de los marcadores relacionados con cyv\_3.1 (o una variante del mismo) para identificar y/o seleccionar plantas o partes de plantas o progenie que comprenda o retenga cyv\_3.1 (o una variante del mismo).

En un aspecto, también se proporciona el uso de una planta diploide o doble haploide de acuerdo con la invención como progenitor macho o hembra, por lo que la planta se cruza con otra planta de sandía o se permite que se autofertilice para producir progenie.

En un aspecto, se proporciona el uso de una planta tetraploide de acuerdo con la invención como progenitor macho o hembra, por lo que la planta se cruza con otra planta de sandía (por ejemplo, con un progenitor diploide macho) o se autoriza para autofertilizar para producir progenie. Especialmente se incluye el uso de un tetraploide como progenitor  
5 femenino en la producción de semilla de sandía triploide híbrida (es decir, producción de semilla F1).

En otro aspecto, se proporciona el uso de plantas triploides de acuerdo con la invención en la producción de frutos triploides sin semillas.

*Semillas y partes de plantas y progenie*

10 Se entiende que también es un objeto de la invención proporcionar semillas a partir de las cuales puedan crecer las plantas diploides, triploides o tetraploides descritas en este documento. También se incluyen aquí plántulas, vástagos y portainjertos, así como células y tejidos de las plantas diploides, haploides dobles, triploides o tetraploides de la invención. Dichas partes de plantas comprenden cyv\_3.1 (o una variante) de acuerdo con la  
15 invención. Una parte de la planta de la planta puede, por ejemplo, ser seleccionada de un vástago, fruto, polen, óvulo, tallo, cotiledón, hoja, célula, embrión, meristemo, antera, raíz, punta de la raíz, pistilo, flor y/o semilla.

También se proporcionan aquí progenie de cualquiera de las plantas según la invención, tales como semillas que se pueden obtener cruzando una planta que comprende cyv\_3.1  
20 (o una variante) descrita aquí con otra planta de sandía y/o autofecundando una planta de acuerdo con la invención para producir semillas F1 y progenie de generación adicional (F2, F3, etc.). La presencia de cyv\_3.1 (o una variante) en la progenie puede determinarse mediante ensayos de resistencia al CVYV y/o análisis de marcadores.

Las plantas de sandía obtenidas (derivadas) u obtenibles (derivables) de plantas de  
25 acuerdo con la invención (por ejemplo, de plantas que comprenden cyv\_3.1 o una variante de las mismas) incluyen plantas obtenidas mediante métodos de reproducción, tales como autofecundación, cruzamiento, retrocruzamiento, selección recurrente, producción doble haploide, selección asistida por marcador, propagaciones clonales, transformantes, etc., en la que las plantas derivadas comprenden al menos un cromosoma 3 recombinante que  
30 comprende cyv\_3.1 (o una variante) de acuerdo con la invención.

En un aspecto, se proporciona una planta de sandía, de la cual se ha depositado un número representativo de semillas con el número de acceso NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666, o progenie de cualquiera de dichas plantas, por ejemplo, obtenido por cruce y/o autofecundación. En un aspecto, se proporciona una semilla de sandía, de la cual se

ha depositado un número representativo de semillas con el número de acceso NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666. También polen, un óvulo, células, tejidos, propagaciones vegetativas obtenidas de estas plantas, o de la progenie de la misma, se proporcionan. En un aspecto, la progenie retiene el cyv\_3.1 de las plantas cuyas semillas se depositaron bajo NCIMB 42449 o NCIMB 42450, NCIMB 42666. En un aspecto, la progenie retiene el fragmento de introgresión en el cromosoma 3 (que comprende cyv\_3.1) de las plantas de las cuales se depositado bajo NCIMB 42449 o NCIMB 42450 NCIMB 42666, o un fragmento más pequeño del fragmento de introgresión, por lo que el fragmento más pequeño retiene el locus que confiere resistencia al CVYV (cyv\_3.1).

10 Mapeo fino, secuenciación y pruebas de alelismo

El locus cyv\_3.1 se encontró en la región entre aproximadamente 2.50 Mb y aproximadamente 12.8 Mb del cromosoma 3, véase la Figura 1. El mapeo fino puede llevarse a cabo utilizando métodos conocidos en la técnica para determinar la posición exacta del locus. Por ejemplo, se pueden generar líneas recombinantes que comprenden partes más pequeñas de la región introgresada y luego se pueden usar ensayos del CVYV para determinar qué fragmento confiere resistencia contra el CVYV (y así retiene el locus). Alternativamente, la región también se puede secuenciar para identificar genes de resistencia candidatos. Usando tales métodos o métodos similares, se pueden identificar marcadores más estrechamente ligado con el locus cyv\_3.1 (o variante), por ejemplo, Se puede identificar un marcador molecular específico del genoma de la sandía silvestre ligado a cyv\_3.1 (o una variante), a una distancia física de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03.

De forma similar, cualquier acceso de sandía silvestre resistente al CVYV, por ejemplo, PI189318 u otros, pueden cruzarse con sandía susceptible al CVYV cultivada para generar una nueva población de mapeo y determinar si la resistencia al CVYV es conferida por cyv\_3.1 o una variante de la misma, es decir, si una resistencia QTL al CVYV se asigna a la misma región del cromosoma 3, el acceso silvestre contiene claramente el locus cyv\_3.1 o una variante del mismo.

Si dos plantas de sandía tienen resistencia al CVYV y no está claro si la resistencia es causada por el mismo QTL, se pueden usar diferentes métodos para verificar si está involucrado el mismo locus (es decir, cyv\_3.1 o una variante). Como se mencionó, las pruebas de marcadores y/o secuenciación y/o mapeo QTL o mapeo fino pueden usarse para determinar si un fragmento de introgresión que confiere resistencia de una sandía silvestre está presente en la región del cromosoma 3. Alternativamente o además una

prueba de alelismo puede llevarse a cabo, es decir, las dos plantas se pueden cruzar y se puede analizar la segregación del fenotipo (resistencia al CVYV) en plantas de progenie.

Los siguientes ejemplos no limitantes describen plantas que comprenden cyv\_3.1 de acuerdo con la invención. A menos que se indique lo contrario en los Ejemplos, se usan  
5 métodos para el cultivo convencional de sandía, tales como por ejemplo, descrito en Maynard 2001, Watermelons - Characteristics, Production and Marketing, ASHS Press; Mohr H.C. Watermelon Breeding in Mark J. Bassett (editor) 1986 Breeding Vegetable Crops, AVI Publishing Company.

### **Información de depósito**

10 Nunhems BV ha depositado semillas de una línea de sandía diploide cultivada, que comprende cyv\_3.1 en forma homocigota y produce frutos con corteza tipo Sweet Crimson con número de acceso NCIMB 42449 y semillas de una línea de sandía diploide cultivada, que comprende cyv\_3.1 en forma homocigota y produciendo frutos con una corteza del tipo  
15 Jubilee bajo el número de acceso NCIMB 42450. Las semillas fueron depositadas por Nunhems BV el 18 de agosto de 2015 en NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido. El acceso a los depósitos estará disponible durante la tramitación de esta solicitud a las personas determinadas por el Comisionado de Patentes y Marcas, que tendrán derecho a ello a petición.

Nunhems B.V. ha depositado semillas de una línea de elite de sandía cultivada diploide,  
20 que comprende cyv\_3.1 en forma homocigota y produce frutas de pulpa roja con el número de acceso NCIMB 42666. Las semillas fueron depositadas por Nunhems B.V. el 26 de septiembre de 2016 en NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido.

Todos los depósitos de semillas se hicieron bajo el Tratado de Budapest y haciendo uso  
25 de la solución de expertos.

Sujeto a 37 C.F.R. § 1.808(b), todas las restricciones impuestas por el depositante sobre la disponibilidad para el público de uno o más depósitos serán irrevocablemente eliminadas al otorgar la patente al permitir el acceso a los depósitos. Los depósitos se mantendrán durante un período de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o por la vida exigible  
30 de la patente, la que sea más larga, y será reemplazada si alguna vez se vuelve inviable durante ese período. El solicitante no renuncia a ningún derecho otorgado bajo esta patente en esta solicitud o en virtud de la Ley de Protección de Variedades Vegetales (7 USC 2321 et seq.).

## **Ejemplos**

### Ejemplo 1: Resistencia al CVYV - mapeo QTL

Se generaron dos poblaciones de mapeo F2 a partir de cruces entre el acceso de sandía silvestre y una línea propietaria endogámica susceptible del CVYV. Las poblaciones fueron genotipificadas con >3000 SNP.

El fenotipificado de las líneas F3 se realizó usando un ensayo CVYV en celdas climatizadas en Italia. La primera hoja verdadera expandida (15 a 20 días después de la siembra) fue inoculada a mano, con una segunda inoculación 4-5 días después de la primera. Las plantas de control se inocularon solo con tampón.

Se inoculó un total de 14 plantas por genotipo con inóculo que contiene el CVYV (cepa tipo Almeria), en dos repeticiones e incluyendo Sugar Baby como control susceptible. Se utilizó un diseño de bloques al azar. El CVYV se mantuvo en el tejido foliar infectado congelado. Para preparar inóculo, la pre-multiplicación del virus se llevó a cabo en la variedad de pepino susceptible Sheila. Después se usaron hojas frescas, jóvenes, sintomáticas de la variedad Sheila para preparar el inóculo (1 gramo de hoja fresca por cada 5 ml de tampón de fosfato 0.03 M, con carbón activo y tierra de diatomáceas se trituraron con un mortero sobre un lecho de hielo).

Las plantas inoculadas se incubaron con 12-14 horas de luz, temperatura del día 25 grados Celsius y temperaturas nocturnas de 18 grados Celsius. Las hojas se puntuaron para los síntomas de CVYV a intervalos regulares (por ejemplo, 20 días después de la inoculación (dpi), 35 ppp, 50 ppp, 65 ppp). El control susceptible, Sugar Baby, debe ser severamente sintomático después de 30 ppp. Las plantas individuales se puntuaron en tres clases: a) susceptibles - presencia de síntomas en las hojas, b) resistentes - sin síntomas en las hojas, c) dudoso. Al menos el 90% de las plantas de una línea deben calificarse como “resistentes” para que la línea se considere resistente.

El mapeo de QTL reveló un QTL mayor para la resistencia al CVYV en el cromosoma 3 en ambas poblaciones de mapeo, que se denominó *cyv\_3.1*.

Para localizar mejor el QTL, se identificaron más marcadores de SNP en el intervalo de confianza. Se identificaron tres marcadores estrechamente relacionados con el QTL, véase la Tabla 1 (*supra*), denominados SNP\_01, SNP\_02 y SNP\_03.

Tabla 3:

SNP	Cromosoma	Posición base en el cromosoma 3
SNP_01	Chr_03	7,586,752
SNP_02	Chr_03	7,664,093
SNP_03	Chr_03	7,693,225

Ejemplo 2: Retrocruzamiento de cyv\_3.1 en líneas de élite

Utilizando el retrocruzamiento asistido por marcadores, cyv\_3.1 se retrocruzó (4 a 6 retrocruzamientos) en varias líneas de élite y se depositaron semillas de dos líneas de élite con los números de acceso NCIMB 42449 y NCIMB 42450.

Las plantas de NCIMB 42449 y NCIMB 42450, y la progenie de autofecundación de las mismas, se evaluaron (fenotipificadas) para resistencia contra CVYV en dos años consecutivos en celdas climatizadas en Murcia, de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1.

10 Los resultados se muestran en la Tabla 4 a continuación:

2014 fenotipificación:				
Línea vegetal	Repetición	Nr. de plantas	Primera evaluación (% de plantas resistentes)	Segunda evaluación (% de plantas resistentes)
NCIMB42449	1	10	100	100
NCIMB42449	2	10	100	100
NCIMB42449	3	10	100	100
NCIMB42450	1	10	80	80
NCIMB42450	2	10	100	100
Línea susceptible	1	10	0	0
Línea susceptible	2	10	30	20
Línea susceptible	1	10	40	0
Línea susceptible	2	10	50	20
Línea susceptible	3	10	40	10

Sugar Baby (control)	Múltiple	50	22	0
2015 fenotipificado:				
Progenie de NCIMB42449	1	14	100	100
Progenie de NCIMB42449	2	13	100	100
Progenie de NCIMB42449	3	14	100	100
Progenie de NCIMB42449	4	15	100	100
Progenie de NCIMB42450	1	15	100	100
Progenie de NCIMB42450	2	15	100	100
Progenie de NCIMB42450	3	14	100	100
Progenie de NCIMB42450	4	14	100	100
Progenie de NCIMB42450	5	14	100	100
Sugar Baby (control)	Múltiple	35	27	0

### Ejemplo 3: Validación de marcador

La validación de estos marcadores sobre una colección de diferentes materiales de sandía produjo el descubrimiento de dos haplotipos para la resistencia al CVYV, por lo que SNP\_01 podría distinguir los haplotipos. Todos los híbridos comerciales evaluados tenían el mismo genotipo que Sugar Baby y todos eran susceptibles al CVYV.

Tabla 5:

	SNP_01	SNP_02	SNP_03	Resistencia al CVYV
Línea endogámica – NCIMB 42666	GG	GG	CC	Resistente
Línea endogámica – NCIMB 42449	AA	GG	CC	Resistente
Línea endogámica – NCIMB42450	AA	GG	CC	Resistente
SUGAR BABY	GG	AA	TT	Susceptible

### Ejemplo 4: La resistencia al ZYMV es un locus independiente en el cromosoma 3

De la literatura, se sabía que la resistencia al ZYMV también se localiza en el cromosoma 3, los inventores querían saber si las plantas resistentes al CVYV también eran resistentes

al ZYMV. Inocularon NCIMB 42449 y NCIMB 42450 con la cepa europea o estadounidense de ZYMV. También volvieron a analizar los datos del marcador SNP para que el SNP publicado se vincule al gen zym, denominado aquí SNP\_04.

Tabla 6:

	SNP_01	SNP_02	SNP_03	SNP_04	Resistencia al CVYV	Resistencia al ZYMV
Línea endogámica no depositada	GG	GG	CC	GG	Resistente	Resistente
Línea endogámica – NCIMB 42449	AA	GG	CC	TT	Resistente	Susceptible
Línea endogámica – NCIMB42450	AA	GG	CC	TT	Resistente	Susceptible
SUGAR BABY	GG	AA	TT	TT	Resistente	Susceptible

5

Los resultados mostraron que cyv\_3.1 y zym son loci independientes en el cromosoma 3 y que SNP\_04 puede usarse para diferenciar entre plantas resistentes y susceptibles al ZYMV.

Ejemplo 5: Líneas tetraploides

- 10 NCIMB 42449 y NCIMB 42450 se usaron para generar líneas tetraploides resistentes al CVYV usando tratamiento con colchicina. Para NCIMB 42449 se hicieron cinco líneas tetraploides putativas, mientras que para NCIMB 42450 se hicieron diez líneas tetraploides putativas.

Ejemplo 6: Selección de accesiones de sandía silvestre

- 15 Progenie de accesos silvestres, diploides, de sandía que se originan, por ejemplo, en la colección GRIN de EE. UU. se analizaron para determinar la resistencia al CVYV y su genotipo SNP para SNP\_01, SNP\_02 y SNP\_03.

Se encontró que una línea, derivada de PI189318, tiene el siguiente genotipo de SNP y el siguiente fenotipo de resistencia:

20

Tabla 7:

	SNP_01	SNP_02	SNP_03	Resistencia al CVYV
PI189318	GG	GG	CC	Resistente

Esta sandía silvestre puede, por lo tanto, usarse para introgresar cyv\_3.1 en sandía cultivada, por ejemplo, por retrocruzamiento.

Opcionalmente, se puede llevar a cabo un ensayo de alelismo, cruzando PI189318 con  
5 plantas cultivadas a partir de semillas depositadas aquí para confirmar que PI189318 contiene el gen cyv\_3.1.

**REIVINDICACIONES**

1. Una planta diploide de sandía cultivada de la especie *Citrullus lanatus ssp. vulgaris*, caracterizada por que dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3, donde dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia al CVYV y donde el fragmento de introgresión comprende un marcador seleccionado del grupo que consiste en:
  - a) una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y
  - b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y
  - c) un marcador molecular específico del genoma de sandía silvestre dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0,5 Mb, 0,1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20 kb, 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03.
2. La planta de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que el fragmento de introgresión es un fragmento que comprende la región que comienza en 2,50 Mb y termina en 12,80 Mb del cromosoma 3, o una parte del mismo en donde la parte tiene un tamaño de al menos 5 kb.
3. La planta de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que la planta produce frutos que comprenden un grado brix de al menos 7,0.
4. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que dicha planta es homocigota para el fragmento de introgresión y la planta es resistente al CVYV y opcionalmente resistente al ZYMV.
5. Una planta de sandía tetraploide hecha doblando los cromosomas de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
6. La planta de sandía tetraploide según la reivindicación 5, caracterizada por que la planta es una línea endogámica.
7. Una semilla de sandía triploide hecha por polinización de la planta tetraploide de la reivindicación 5 o 6 con polen de la planta de sandía diploide de la reivindicación 4.
8. Una planta triploide cultivada a partir de la semilla de la reivindicación 7.

9. Semilla a partir de la cual se puede cultivar una planta de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
10. Una propagación vegetativa de una planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8.
- 5 11. Un cultivo celular o tisular de una planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8, caracterizado por que las células o tejidos comprenden el fragmento de introgresión.
- 10 12. El cultivo celular o tisular según la reivindicación 11, que comprende células o protoplastos o tejido vegetal de una parte de la planta seleccionada del grupo que consiste de: vástago, fruto, embrión, meristemo, cotiledón, polen, óvulo, hoja, antera, raíz, punta de la raíz, pistilo, flor, semilla, tallo.
- 15 13. Una parte de planta de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada por que dicha parte se selecciona de un vástago, fruto, polen, óvulo, tallo, cotiledón, hoja, célula, embrión, meristema, antera, raíz, punta de raíz, pistilo, flor, semilla y en donde las células de dicha parte de la planta comprenden el fragmento de introgresión.
14. Una planta de sandía regenerada a partir del cultivo de células o tejidos de la reivindicación 11.
- 20 15. Un método para seleccionar semillas de sandía, plantas o partes de plantas o ADN de tales semillas, plantas o partes de plantas para la presencia de uno o más marcadores relacionados con la resistencia al CVYV en el cromosoma 3, en que dicho método comprende determinar la presencia de:
- 25 a) una guanina (G) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 2 (SNP\_02) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
- b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de la SEQ ID NO: 3 (SNP\_03) o una secuencia que comprende al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y/o
- 30 c) un marcador molecular específico del genoma de sandía silvestre dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0.5 Mb, 0.1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20 kb, 10 kb, 5 kb, 2 kb, 1 kb o menos de SNP\_02 o SNP\_03.

16. Un método para producir semillas de sandía híbrida triploide en el que las plantas cultivadas a partir de tales semillas son resistentes al CVYV, en que dicho método comprende:

5

- a) proporcionar una planta de sandía diploide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y una planta tetraploide según la reivindicación 5 o 6,
- b) permitir la polinización de las flores de la planta tetraploide con polen de la planta diploide, y
- c) cosechar semillas producidas en los frutos de la planta tetraploide.

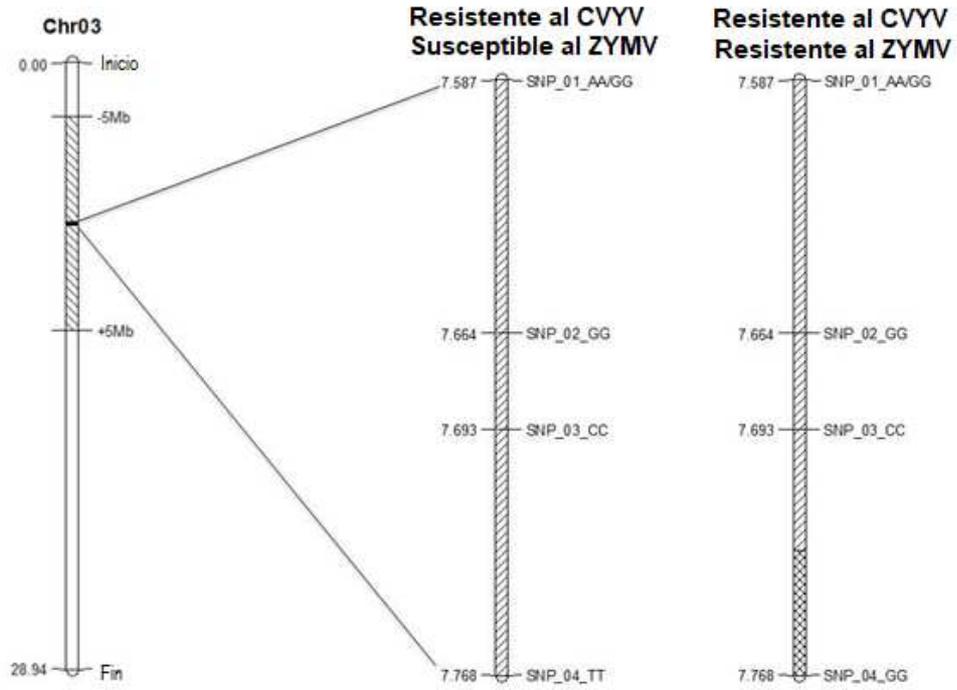
17. Un método para la producción de fruta de sandía triploide sin semillas, en que dicho método comprende:

10

- (a) intercalar semillas híbridas triploides o plantas híbridas triploides según la reivindicación 7 u 8 con plantas polinizadoras diploides, y opcionalmente
- (b) cosechar los frutos de sandía sin semillas producidos en las plantas triploides de (a).

15

Figura 1



# ES 2 667 441 A2

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Nunhems B.V.

<120> Plantas de sandía con resistencia al virus de las venas amarillas del pepino (CVYV)  
del pepino (CVYV)

<130> BCS15-8040

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 151  
<212> ADN  
<213> Citrullus lanatus

<220>  
<221> SNP01  
<222> (76)..(76)

<400> 1  
ggggcgaata aaataaaata aataaatttg gtagggttgg agtgaataa aggagatttt 60  
attttatttg gttgaagaaa caaaaaggga aaaattggaa ttaagggttt aaggagggag 120  
aggaattagg gtttagttta atcccaccct c 151

<210> 2  
<211> 151  
<212> ADN  
<213> Citrullus lanatus

<220>  
<221> SNP02  
<222> (76)..(76)

<400> 2  
tcagtcatag tatagtggaa tatttgactg caggtataag actcaacttc agaaagatcc 60  
agaccttttt tttaagagag agagagagag agagagagag agaactagaa acaacaattt 120  
ccaccaaaaag aatgaaaaga gactaagact c 151

<210> 3  
<211> 151  
<212> ADN  
<213> Citrullus lanatus

<220>  
<221> SNP03  
<222> (76)..(76)

<400> 3  
cgagttggct attagagttg atcgttggag atgattgact gagttagttg ctagaggtgg 60  
tcgttgagtt ggttgccgaa ggtattcgtc agggctagtt gcgaagttgg gctttggaga 120  
agtggagata gtcattgtag ttgattgatg g 151

ES 2 667 441 A2

<210> 4  
<211> 340  
<212> ADN  
<213> Citrullus lanatus

<220>  
<221> SNP04  
<222> (70)..(70)

<400> 4  
tgaagttcta cctccaaaac tcctcaacag tagagaaggt atagatcggt cggatagacg 60  
caccccaggg ggcttgctta gacttggcgg atgggttatt gaaccaaag gtccaagagt 120  
gctcaagagg gtgaggctga tgcactatcg ccgccgaca attggacgag tcaaggctgt 180  
cgtctccgac gatctctcct tcctcaagtt cctcatcttc atcaccgcct cgtcctctag 240  
ggttttgatt tgcaatggta ttagaaagat cttccgtgga ttagctttg atcgtctctt 300  
cgactaccat tttcctttca ctacttgtgg aattgagcgt 340