

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 940**

51 Int. Cl.:

A01H 5/02 (2008.01)

A01H 5/08 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2013 E 13195763 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2740350**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para la expresión sexual en sandía**

30 Prioridad:

04.12.2012 US 201261733344 P

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

11.06.2018

73 Titular/es:

**SEMINIS VEGETABLE SEEDS, INC. (100.0%)
800 N. Lindbergh Blvd.
St. Louis MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**ABDEL HALEEM, HUSSEIN;
KNAPP, STEVEN;
MCGREGOR, CECILIA y
PROTHRO, JASON**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 671 940 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones para la expresión sexual en sandía

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo del cultivo de plantas y, más específicamente, a procedimientos para producir plantas de sandía con expresión de fenotipos sexuales deseados.

Antecedentes de la invención

10 Los avances en genética molecular han hecho posible seleccionar plantas basándose en marcadores genéticos ligados a rasgos de interés, un procedimiento denominado selección asistida por marcadores (SAM). Aunque los esfuerzos en los cultivos hasta la fecha han proporcionado una serie de líneas y variedades útiles de sandía con rasgos beneficiosos, aún permanece una necesidad en la técnica por la selección de variedades con rasgos adicionales y procedimientos mejorados para su producción. En muchos casos, tales esfuerzos se han visto obstaculizados por dificultades en la identificación y en el uso de alelos que confieren rasgos beneficiosos. Estos esfuerzos se pueden confundir por la ausencia de ensayos fenotípicos definitivos y otros problemas tales como la epistasia y la herencia poligénica o cuantitativa. En ausencia de herramientas moleculares tales como SAM, puede
15 no ser práctico intentar producir ciertos genotipos nuevos de plantas de cultivo debido a tales desafíos.

Sumario de la invención

La invención proporciona un procedimiento de detección, en al menos una planta de sandía, de un genotipo asociado con la expresión del fenotipo sexual de ZWRM línea PI593359 de aproximadamente el 100 por ciento femeninas del total de flores pistiladas, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 20 (i) detectar en al menos una planta de sandía un alelo que se asocia con la expresión sexual del fenotipo, en la que el alelo comprende la región genómica flanqueada por los loci NW0248967 (SEQ ID NO:1) y NW0248118 (SEQ ID NO:3) sobre el grupo de enlace 2 (LG2) hallado en ZWRM línea PI593359, y
(ii) seleccionar al menos una planta de sandía que posee dicho alelo de ZWRM línea PI593359.

25 El término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o procedimiento que se está empleando para determinar el valor. El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para referirse a "y/o" salvo se indique explícitamente lo contrario para referirse solo a alternativas o las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación mantiene una definición que se refiere solo a alternativas y a "y/o". Cuando se usa en conjunto con la palabra "que comprende" u otro lenguaje abierto en las reivindicaciones, las palabras "un" y "una" denotan "uno o más", salvo que se indique específicamente.
30 Los términos "comprende", "tiene" e "incluye" son verbos de conexión no sujetos a limitaciones. Cualquier forma o tiempo de uno o más de estos verbos, tales como "comprende", "que comprende" "tiene", "que tiene", "incluye" y "que incluye", también son no sujetos a limitaciones. Por ejemplo, cualquier procedimiento que "comprende", "tiene" o "incluye" una o más etapas no se limita a poseer solo aquellas una o más etapas y también abarca otras etapas no enumeradas. Asimismo, cualquier planta que "comprende", "tiene" o "incluye" uno o más rasgos no se limita a poseer solo aquellos uno o más rasgos y abarca otros rasgos no enumerados.
35

Otros objetos y características serán en parte evidentes y en parte señalados en lo sucesivo en este documento.

Breve descripción de los dibujos

- 40 **FIG. 1:** Muestra las flores (A) masculinas y (B) femeninas de *C. lanatus* var. *lanatus* (ZWRM; PI 593359) y (C) una flor andromonoica de *C. lanatus* var. *citroides* (CTR; PI 244019).
FIG. 2: Muestra la frecuencia de distribución (a) del porcentaje de flores masculinas, (b) del porcentaje de flores femeninas, (c) del porcentaje de flores hermafroditas y (d) del porcentaje de femeninas del total de flores pistiladas en las primeras veinte flores de la cepa principal de la población F₂ de *C. lanatus* var. *lanatus* (ZWRM; PI 593359) x *C. lanatus* var. *citroides* (CTR; PI 244019). Se indican los fenotipos parentales (ZWRM y CTR).
45 **FIG. 3:** Muestra los loci de rasgos cuantitativos (QTL) identificados para el porcentaje de masculinas (Masculinas), el porcentaje de femeninas (Femeninas), el porcentaje de hermafroditas (HM) y el porcentaje de femeninas de flores pistiladas (F/P) en las primeras veinte flores de la cepa principal de la población F₂ de *C. lanatus* var. *lanatus* (ZWRM; PI 593359) x *C. lanatus* var. *citroides* (CTR; PI 244019). La longitud de las barras es igual al intervalo del soporte 1-LOD y el número entre paréntesis es el porcentaje de variación fenotípica explicada por los QTL (R²). El área sombreada en LG 11A muestra la localización de u QTL asociado con la forma del fruto identificado previamente en la misma población.
50

Breve descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO:1 - Marcador NW0248967.

SEQ ID NO:2 - Marcador NW0248583.

SEQ ID NO:3 - Marcador NW0248118.

SEQ ID NO:4 - Marcador NW0252278.

SEQ ID NO:5 - Marcador NW0248560.

SEQ ID NO:6 - Marcador NW0248392.

5 SEQ ID NO:7 - Marcador NW0248711.

SEQ ID NO:8 - Marcador NW0249365.

SEQ ID NO:9 - Marcador NW0250112.

SEQ ID NO:10 - Marcador NW0250956.

SEQ ID NO:11 - Marcador NW0251455.

10 SEQ ID NO:12 - Marcador NW0249392.

SEQ ID NO:13 - Marcador NW0248268.

Descripción detallada de la invención

15 La invención representa una ventaja en la materia en que permite el desarrollo de variedades de sandía con expresión de fenotipos sexuales deseados. La expresión sexual es importante para los cultivadores de sandía, dado que la mayoría de las variedades cultivadas de manera comercial son híbridos F₁. Las formas andromonoicas son altamente indeseables como parentales de semillas, dado que las plantas hermafroditas requieren la emasculación antes de la polinización cruzada. Además del rasgo andromonoico, la proporción de flores estaminadas:flores pistiladas es también de interés para los cultivadores. Las variedades cultivadas de sandía comercial normalmente tienen una proporción aproximada de flores estaminadas:flores pistiladas de 7:1 (Wehner, Watermelon, págs. 381-4, En: Prohens, J. y Nuez, F. (eds.), Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae. Springer, Nueva York, NY, 2008), pero esta proporción puede variar enormemente. Para la producción de híbridos F₁, el carácter dioico (plantas masculinas y femeninas separadas) es deseable, pero esto no se ha observado en las sandías (Rudich y Zamski, Citrullus lanatus, págs. 272-274. En: Halevy, A. (ed.), Handbook of flowering. CRC Press, Boca Raton, FL, 1985; Salman-Minkov y col., Plant Cell Physiol 49:740-750, 2008).

25 La presente invención, por lo tanto, representa una ventaja significativa proporcionando procedimientos para la producción de plantas de sandía que comprende al menos un primer locus introgresado que contribuye a la expresión del fenotipo sexual deseado. De acuerdo con la invención, el alelo del locus introgresado se puede introgresar de nuevo en un fondo genómico deseado de una variedad o cultivo específico. Por ejemplo, tal como se trata adicionalmente a continuación, se puede producir una sandía que tiene una expresión de fenotipo sexual deseada para que tenga uno o más rasgos seleccionados a partir de un porcentaje de femeninas deseado de un total de plantas pistiladas. Se proporcionan procedimientos de detección, en una planta de sandía, de un genotipo asociado a la expresión del fenotipo sexual deseado, en particular, a procedimientos de identificación y de selección de una planta de sandía que comprende en su genoma un genotipo asociado a la expresión del fenotipo sexual deseado. Además, se desvelan procedimientos de producción de una planta de sandía que comprende en su genoma al menos un locus introgresado asociado a la expresión del fenotipo sexual deseado y a procedimientos para la introgresación de tal alelo en una planta de sandía. También se desvelan las plantas de sandía y las partes de las mismas creadas mediante cualquiera de dichos procedimientos, así como secuencias de ácido nucleico polimórfico que se pueden usar en la producción e identificación de tales plantas.

40 Al proporcionar marcadores para inferir la expresión de un fenotipo sexual de interés, la invención da como resultado una economización significativa al permitir la sustitución de ensayos de fenotipificación costosos, intensivos en el tiempo y probablemente no fiables, con el genotipado. Además, se pueden diseñar programas de cultivo para dirigir de manera explícita la frecuencia de fenotipos específicos favorables centrándose en genotipos particulares. La fidelidad de estas asociaciones se puede controlar de manera continua para asegurar la capacidad predictiva mantenida y, por tanto, las decisiones de cultivo informadas.

45 De acuerdo con la invención, un experto en la materia puede identificar, por lo tanto, una fuente de germoplasma candidata que posee una expresión de fenotipo sexual deseada tal como se describe en el presente documento, pero que carece de uno o más rasgos que el cultivador de plantas busca tener en una variedad o en una línea parental de la misma. Las técnicas de la invención se pueden usar para identificar la expresión de fenotipos sexuales deseados identificando marcadores genéticos asociados con el fenotipo, o tales técnicas pueden emplear ensayos fenotípicos para identificar plantas deseadas bien solos o en combinación con ensayos genéticos, identificando de ese modo también un genotipo marcador asociado con el rasgo que se puede usar para la producción de nuevas variedades con los procedimientos descritos en el presente documento.

Generalmente, la expresión sexual en sandías se puede dividir en categorías cualitativas como ser monoicas (flores masculinas y flores femeninas separadas en la misma planta), andromonoica (flores masculinas y flores hermafroditas separadas en la misma planta) y trimonoicas (flores masculinas, flores femeninas y flores hermafroditas separadas en la misma planta) (Ferreira y col., *Crop Breeding Appl Biotechnol* 2:39-48, 2002; Maynard, *An introduction to the watermelon*, págs. 9-20. En: Maynard, D. N. (ed.), *Watermelon characteristics, production and marketing*. ASHS Press, Alexandria, VA, 2001; Robinson y col., *Cucurbits*. CAB International Publishing, Wallingford, Reino Unido, 1997; Rosa, *Hilgardia* 3:233-250, 1928).

De acuerdo con la invención, una expresión de un fenotipo sexual deseado se refiere al porcentaje de femeninas del total de flores pistiladas que uno o más cultivadores, productores o consumidores pueden encontrar ventajoso para determinadas aplicaciones. Tal como se explica, en determinados aspectos, la expresión de un fenotipo sexual dioico puede ser deseable para aplicaciones que incluyen la producción de híbridos F₁. Además, para fines de cultivo, puede ser deseable producir plantas de sandía con las proporciones particulares de flores estaminadas: flores pistiladas. El fenotipo particular puede depender de los usos finales deseados. Sin embargo, dado que los rasgos en cuestión han demostrado estar controlados por las regiones de los QTL identificadas en el presente documento, estos rasgos se pueden introgresar en fondos genéticos deseados usando los procedimientos de la invención.

La presente invención se refiere a QTL de sandía asociados con la expresión sexual. Este rasgo es importante durante la producción de plantas híbridas de sandía, que se producen cruzando una planta parental de semilla con una planta parental de polen. Típicamente, una línea parental endogámica femenina y una línea endogámica donadora de polen (masculina) se cruzan para producir un híbrido comercial dado. Por ejemplo, las sandías híbridas sin semilla se pueden producir cruzando una planta parental diploide con una planta parental tetraploide. La expresión del sexo es importante para este procedimiento, en particular, porque se debe hacer la emasculación de flores hermafroditas sobre una planta que se va a usar como el parental femenino para evitar la autofecundación. Por lo tanto, es ventajoso para la planta parental femenina que tenga muy pocas anteras. Para las plantas parentales masculinas, por otra parte, es beneficioso un gran número de anteras y un correspondiente número bajo de flores femeninas para asegurar un suministro adecuado de polen y evitar la autofecundación.

Los QTL desvelados pueden ser útiles en el desarrollo de líneas polinizadoras de sandía. Tales QTL permiten la producción de plantas de sandía con una frecuencia reducida de anteras sobre flores femeninas de plantas endogámicas parentales de semilla durante la producción de semillas híbridas, que dan como resultado de este modo un aumento en el porcentaje de hibridación de la semilla producida (menos semillas autopolinizadas). Se desvelan marcadores y QTL ligados al porcentaje de flores femeninas y a procedimientos de uso de los mismos para seleccionar líneas parentales que podrían servir mejor como parentales de semilla femeninos para la producción de híbridos.

La invención, por lo tanto, proporciona la introgresión de al menos un primer locus que confiere una expresión de fenotipo sexual deseado en un fondo genético dado. La producción exitosa de sandía depende de la atención a diversas prácticas hortícolas. Éstas incluyen la gestión del suelo con especial atención a la adecuada fertilización, el establecimiento de cultivos con el espaciado apropiado, control de malezas, la introducción de abejas u otros insectos para la polinización, la irrigación, el control de plagas y, si se producen frutos a partir de plantas triploides, una fuente de polen adecuada para producir sandías sin semillas (triploides). El tamaño y la forma de la flor de la sandía; el color, el espesor y la dureza de la corteza; la expresión sexual, el color, y el número; el color, la textura y el contenido en azúcar de la pulpa; y la ausencia de defectos en la fruta son todas características importantes que se deben considerar en la selección de variedades de sandía.

Los cultivos de sandía se pueden establecer a partir de semillas o de trasplantes. El trasplante puede dar como resultado un cultivo anterior en comparación con un cultivo producido a partir de la siembra directa. Cuando un cultivador quiere producir un cultivo con frutos sin semillas, el trasplante puede ser preferible. El trasplante ayuda a lograr que la planta se mantenga erguida rápidamente, especialmente cuando los mayores costes de las semillas, como las semillas triploides, hacen que la siembra directa sea un riesgo.

Los cultivadores de sandía se enfrentan al reto de anticiparse a los cambios en las condiciones de crecimiento, a las presiones de los patógenos y a los cambios en las preferencias de los consumidores. Con estas proyecciones, un cultivador tratará de crear nuevas variedades de cultivo que se ajustarán a las necesidades de desarrollo de los cultivadores, proveedores, minoristas y consumidores. Por lo tanto, el cultivador se enfrenta al reto de combinar en un único genotipo tantos atributos favorables como sea posible para una buena distribución y alimentación del cultivo.

Desarrollo de variedades de sandía con expresión de fenotipos sexuales deseados

Tal como se indica, la expresión del sexo es importante en términos de producción de plantas híbridas F₁, y tiene importancia para los cultivadores, procesadores, minoristas y consumidores. Los presentes inventores han identificado loci de rasgos cuantitativos (QTL, del inglés *quantitative trait loci* con efectos principales para la expresión del sexo, así como marcadores de polimorfismo de nucleótido único (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) ligados genéticamente a y predictivos de tales loci que se pueden usar para el seguimiento y la introgresión de QTL en germoplasma deseable, tal como mediante selección asistida por marcadores y/o

retrocruzamiento asistido por marcadores.

Tal como se describe en el presente documento en un ejemplo, se desarrolló una población inter-subespecífica F₂ mediante un cruzamiento entre *C. lanatus* var. *lanatus* ZWRM 50 de China (ZWRM; PI 593359) y una muestra de *C. lanatus* var. *citroides* silvestre de Sudáfrica (CTR; PI 244019). Se autopolinizó una única planta F₁ para obtener semillas de F₂. La identificación de loci de rasgos cuantitativos (QTL) asociados con el porcentaje de masculinos (% de M), con el porcentaje de femeninos (% de F), con el porcentaje de hermafroditas (% de HM) y con el porcentaje de femeninos de flores pistiladas (femenino + hermafrodita) (% de F/P) se llevó a cabo sobre estas plantas F₂. Se identificaron cuatro regiones cromosómicas que se asociaron con la expresión sexual en sandías. El QTL principal para el % de F, el % de HM y el % de F/P se colocó sobre LG 11A y explicó el 31,3 - 37,7 % de la variación fenotípica observada para los tres rasgos. Los marcadores ligados a dos de las cuatro regiones cromosómicas identificadas se localizaron en 1 Mb de gen de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACS) en el genoma de la sandía.

La invención, por lo tanto, contempla el seguimiento y la introducción de cualquiera de esos QTL y cualquiera de las combinaciones de los mismos en un fondo genético dado. Un experto en la materia entenderá que cualquier expresión de fenotipo sexual deseado que incluya uno o más rasgos del porcentaje de flores masculinas, del porcentaje de flores femeninas, del porcentaje de flores hermafroditas, del porcentaje de flores femeninas del total de flores pistiladas, y/o cualquiera y todas las combinaciones de los mismos se pueden introducir de un genotipo a otro usando un locus primario descrito en el presente documento mediante una selección asistida por marcadores. Por consiguiente, se puede seleccionar una fuente de germoplasma de manera que tenga una expresión del fenotipo sexual en términos del porcentaje de flores masculinas, del porcentaje de flores femeninas, del porcentaje de flores hermafroditas, del porcentaje de femeninas del total de flores pistiladas. Un cultivador actualmente puede seleccionar una expresión del fenotipo sexual deseado o seguir tal expresión del fenotipo sexual durante el cultivo usando la selección asistida por marcadores para la región descrita en el presente documento. Con la presente divulgación, un experto en la materia puede introducir la expresión del fenotipo sexual deseado en cualquier fondo genético.

Por lo tanto, los QTL identificados en el presente documento se pueden usar para la selección asistida por marcadores para la expresión sexual en sandías. Este descubrimiento de los QTL de expresión sexual facilitará el desarrollo de sandías que tengan la expresión de los fenotipos sexuales deseados.

Para la mayoría de los objetivos del cultivo, los cultivadores comerciales pueden trabajar en el germoplasma, que a menudo se cita como el "tipo cultivado" o "élite". Con este germoplasma es más fácil cultivar porque generalmente tiene buen rendimiento cuando se evalúa el rendimiento hortícola. La ventaja del rendimiento que proporciona un tipo cultivado a veces se contrarresta con una carencia de diversidad alélica. Este es el equilibrio que acepta un cultivador cuando trabaja con germoplasma cultivado con un mejor rendimiento general, pero que carece de diversidad alélica. Los cultivadores generalmente aceptan este equilibrio porque el progreso es más rápido cuando se trabaja con material cultivado que cuando se cultiva con fuentes genéticamente diversas.

Por el contrario, cuando el cultivador hace o bien cruzamientos intraespecíficos o bien cruzamientos interespecíficos, tiene lugar un equilibrio inverso. En estos ejemplos, un cultivador típicamente cruza germoplasma cultivado con un tipo no cultivado. En tales cruzamientos, el cultivador puede obtener acceso a nuevos alelos del tipo no cultivado, pero puede tener que superar la carga genética asociada con el parental donador. Debido a la dificultad con esta estrategia de cultivo, esta estrategia a menudo falla debido a los problemas de fertilidad y de fecundidad. La dificultad con esta estrategia de cultivo se da en muchos cultivos, y se ejemplifica con un importante fenotipo resistente a enfermedades que se describió en primer lugar en la planta de tomate en 1944 (Smith, Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 44:413-16). En este cruzamiento, se transfirió resistencia a la enfermedad causada por nemátodos desde *L. peruvianum* (PI128657) a una planta de tomate cultivada. A pesar del cultivo intensivo, no fue hasta mediados de la década de 1970 antes de que los cultivadores pudieran superar la carga genética y sacar líneas exitosas que llevaran este rasgo. De hecho, incluso hoy en día, los cultivadores de tomates administran este gen de resistencia a la enfermedad a una variedad híbrida de solo un parental.

En las sandías, las muestras de introducción de plantas son típicamente líneas que producen frutos con cualidades alimenticias y de producción indeseables. Incluso aunque estas líneas tienen malas cualidades hortícolas, algunos cultivadores de sandías, como algunos cultivadores de otros cultivos, tratan de cultivar con estas líneas PI porque potencialmente contienen nuevos alelos. Hasta la fecha, el objetivo de cultivo que se intenta con más frecuencia mediante el uso de las líneas PI es introducir nuevos genes de resistencia a enfermedades. El procedimiento de introducir nuevos genes de resistencia de las líneas PI en tipos comerciales aceptables es un procedimiento largo y, a menudo, arduo. Este procedimiento puede ser difícil porque el rasgo puede ser poligénico, o puede tener una baja heredabilidad, o puede tener una carga de ligamiento o alguna combinación de los mismos.

Algunos fenotipos se determinan mediante el genotipo en un locus. Estos rasgos sencillos, como los estudiados por Gregor Mendel, entran dentro de categorías discontinuas tales como semillas verdes o amarillas. La mayoría de las variaciones observadas en la naturaleza, sin embargo, son continuas, como la productividad en los campos de maíz o la presión arterial humana. A diferencia de los rasgos hereditarios simples, la variación continua puede ser resultado de la herencia poligénica. Los loci que afectan a la variación continua se denominan QTL. La variación en

el fenotipo de un rasgo cuantitativo es el resultado de la composición alélica en los QTL y del efecto ambiental. La heredabilidad de un rasgo es la proporción de la variación fenotípica atribuida a la variabilidad genética. Esta proporción varía entre 0 y 1,0. Por lo tanto, un rasgo con heredabilidad cerca de 1,0 no está muy afectado por el ambiente. Los expertos en la materia reconocen la importancia de generar líneas comerciales con rasgos hortícolas de alta heredabilidad debido a que estas variedades de cultivo permitirán a los productores producir un cultivo con especificaciones de mercado uniformes.

Región genómica, QTL, ácidos nucleicos polimórficos y alelos asociados con la expresión de fenotipos sexuales en sandías

Los solicitantes han descubierto una región genómica, QTL, alelos, ácidos nucleicos polimórficos y marcadores ligados que, cuando están presentes en determinadas formas alélicas, se asocian con la expresión del fenotipo sexual en sandías.

Usando una población intersubespecífica F_2 de *C. lanatus* var. *lanatus* x *C. lanatus* var. *citroides*, se identificaron nueve M-QTL en cuatro grupos de ligamiento (LG, del inglés *Linkage group*) (LG2, LG7, LG10, LG11A) para los tres rasgos del porcentaje de flores masculinas, del porcentaje de flores femeninas, del porcentaje de flores hermafroditas, del porcentaje de femeninas del total de flores pistiladas.

LG2

Se localizó una región genómica asociada a la expresión del fenotipo sexual en el grupo de ligamiento 2 de las sandías, flanqueada por los loci NW0248967 (SEQ ID NO:1) y NW0248118 (SEQ ID NO:3).

Algunas de las diversas realizaciones de la presente divulgación utilizan, por lo tanto, uno o más QTL o marcadores de ácido nucleico polimórfico o alelos localizados en una o más de estas regiones o subregiones en LG2.

Se descubrió que dos QTL de expresión del sexo en sandías se localizaban dentro de esta región. Algunas de las diversas realizaciones de la presente divulgación utilizan uno o más QTL o marcadores de ácido nucleico polimórfico o alelos localizados en esta región genómica. Los marcadores que flanquean en LG2 que identifican una región genómica asociada con la expresión de un fenotipo sexual deseado incluyen los loci NW0248967 (SEQ ID NO:1) y NW0248118 (SEQ ID NO:3). Los marcadores que intervienen en LG2 que identifican una región genómica asociada con la expresión de un fenotipo sexual deseado incluyen NW0248118 (SEQ ID NO:3) y NW0251455 (SEQ ID NO:11). Estas regiones genómicas o subregiones de las mismas, asociadas con la expresión de un fenotipo sexual deseado, se pueden describir como que están flanqueadas por: los loci NW0248967 (SEQ ID NO:1) y NW0248118 (SEQ ID NO:3); los loci NW0248967 (SEQ ID NO:1) y NW0251455 (SEQ ID NO:11); o los loci NW0248118 (SEQ ID NO:3) y NW0251455 (SEQ ID NO:11).

LG7

Se localizó otra región genómica asociada a la expresión del fenotipo sexual en el grupo de ligamiento 7 de las sandías, flanqueada por los loci NW0252278 (SEQ ID NO:4) y NW0248560 (SEQ ID NO:5) en el grupo de ligamiento 7 (LG7). Se descubrió que un QTL de expresión del sexo en sandías se localizaba dentro de esta región. Algunas de las diversas realizaciones de la presente divulgación utilizan, por lo tanto, uno o más QTL o marcadores de ácido nucleico polimórfico o alelos localizados en esta región genómica. Los marcadores que flanquean que identifican una región genómica asociada con la expresión de un fenotipo sexual deseado incluyen los loci NW0252278 (SEQ ID NO:4) y NW0248560 (SEQ ID NO:5) en el grupo de ligamiento 7 (LG7). Los marcadores que intervienen en LG7 que identifican una región genómica asociada con la expresión de un fenotipo sexual deseado incluyen NW0249392 (SEQ ID NO:12). Esta región genómica o subregiones de la misma, asociadas con la expresión de un fenotipo sexual deseado, se pueden describir como que están flanqueadas por: los loci NW0252278 (SEQ ID NO:4) y NW0248560 (SEQ ID NO:5); los loci NW0252278 (SEQ ID NO:4) y NW0249392 (SEQ ID NO:12); o los loci NW0248560 (SEQ ID NO:5) y NW0249392 (SEQ ID NO:12).

LG10

Se localizó una región genómica asociada a la expresión del fenotipo sexual en el grupo de ligamiento 10 de las sandías, flanqueada por los loci NW0248392 (SEQ ID NO:6) y NW0248711 (SEQ ID NO:7)

Se descubrió que dos QTL de expresión del sexo en sandías se localizaban dentro de esta región. Algunas de las diversas realizaciones de la presente divulgación utilizan uno o más QTL o marcadores de ácido nucleico polimórfico o alelos localizados en esta región genómica. Los marcadores que flanquean que identifican una región genómica asociada con la expresión de un fenotipo sexual deseado incluyen los loci NW0248392 (SEQ ID NO:6) y NW0248711 (SEQ ID NO:7). Los marcadores que intervienen en LG10 que identifican una región genómica asociada con la expresión de un fenotipo sexual deseado incluyen NW0248268 (SEQ ID NO:13). Esta región genómica o subregiones de la misma, asociadas con la expresión de un fenotipo sexual deseado, se pueden describir como que están flanqueadas por: los loci NW0248392 (SEQ ID NO:6) y NW0248711 (SEQ ID NO:7); los

loci NW0248392 (SEQ ID NO:6) y NW0248268 (SEQ ID NO:13); o los loci NW0248711 (SEQ ID NO:7) y NW0248268 (SEQ ID NO:13).

LG11A

5 Se localizó una región genómica asociada a la expresión del fenotipo sexual en el grupo de ligamiento 11A de las sandías, flanqueada por los loci NW0249365 (SEQ ID NO:8) y NW0250112 (SEQ ID NO:9).

10 Se descubrió que cuatro QTL de expresión del sexo en sandías se localizaban dentro de esta región. Algunas de las diversas realizaciones de la presente divulgación utilizan uno o más QTL o marcador de ácido nucleico polimórfico o alelo localizados en esta región genómica. Los marcadores que flanquean en LG11A que identifican una región genómica asociada con la expresión de un fenotipo sexual deseado incluyen los loci NW0249365 (SEQ ID NO:8) y NW0250112 (SEQ ID NO:9); los loci NW0249365 (SEQ ID NO:8) y NW0250956 (SEQ ID NO:10); o los loci NW0250956 (SEQ ID NO:10) y NW0250112 (SEQ ID NO:9). Los marcadores que intervienen en LG11A que identifican una región genómica asociada con la expresión de un fenotipo sexual deseado incluyen los loci NW0250956 (SEQ ID NO:10). Esta región genómica o subregiones de la misma, asociadas con la expresión de un fenotipo sexual deseado, se pueden describir como que están flanqueadas por: los loci NW0249365 (SEQ ID NO:8) y NW0250112 (SEQ ID NO:9); los loci NW0249365 (SEQ ID NO:8) y NW0250956 (SEQ ID NO:10); o los loci NW0250112 (SEQ ID NO:9) y NW0250956 (SEQ ID NO:10).

20 Los marcadores anteriores y los estados alélicos son ejemplares. Un experto en la materia reconocería cómo identificar plantas de sandía con otros marcadores de ácido nucleico polimórfico y estados alélicos de las mismas relacionados con la expresión sexual en sandías consistente con la presente divulgación. Un experto en la materia también sabría cómo identificar el estado alélico de otros marcadores de ácido nucleico polimórfico localizados en la(s) región(es) genómica(s) o ligado a los QTL u otros marcadores identificados en el presente documento, para determinar su asociación con la expresión sexual en sandías.

25 Las sandías son diploides naturales, que tienen sus cromosomas dispuestos en pares. Las plantas de sandía, sin embargo, se pueden someter a una duplicación de su conjunto entero de cromosomas y existir como tetraploides. Aunque no es común para las sandías producir tetraploides espontáneos, este proceso se puede producir de manera habitual en el laboratorio usando técnicas de biología celular. Las semillas triploides se pueden producir cruzando un parental tetraploide con un parental diploide. Cuando se cultivan plantas triploides, la formación de semillas en el fruto se detiene debido a las diferencias en el nivel de ploidía, lo que da como resultado frutos sin semilla.

30 En determinadas realizaciones de los procedimientos desvelados, una planta parental diploide es homocigótica para los QTL o un alelo de marcador de ácido nucleico polimórfico asociado con la expresión del fenotipo sexual deseado. El parental diploide se cruza con un tetraploide que carece de los QTL o de un alelo de marcador de ácido nucleico polimórfico asociado con la expresión del fenotipo sexual deseado, para producir una progenie híbrida triploide. Esto da como resultado una copia de los QTL o del alelo del marcador polimórfico asociado con la expresión del fenotipo sexual deseado (del parental diploide) y dos alelos no de QTL/de marcador (del parental tetraploide) en el híbrido triploide. Como alternativa, en determinadas realizaciones de los procedimientos desvelados, una planta parental tetraploide es homocigótica para los QTL o para un alelo de marcador de ácido nucleico polimórfico asociado con la expresión del fenotipo sexual deseado. El parental tetraploide se cruza con un diploide que carece de QTL o un alelo de marcador de ácido nucleico polimórfico asociado con la expresión del fenotipo sexual deseado, para producir una progenie híbrida triploide. Esto da como resultado dos copias de los QTL o del alelo del marcador polimórfico asociado con la expresión del fenotipo sexual deseado (del parental tetraploide) y un alelo no de QTL/de marcador (del parental diploide) en el híbrido triploide.

45 Determinadas realizaciones contemplan el uso de la dihaploidización para producir una línea endógama. Una planta haploide tiene solo una copia de cada cromosoma en lugar del par normal de los cromosomas en una planta diploide. Las plantas haploides se pueden producir, por ejemplo, mediante tratamiento con un inductor haploide. Las plantas haploides se pueden someter a un tratamiento que provoca que se duplique el conjunto de cromosomas de copia única, produciendo una copia duplicada del conjunto original. La planta resultante se denomina "doble haploide" y contiene pares de cromosomas que están generalmente en un estado alélico homocigótico en cualquier locus dado. La dihaploidización puede reducir el tiempo que se requiere para desarrollar nuevas líneas endogámicas en comparación con el desarrollo de líneas mediante rondas sucesivas de retrocruzamiento.

55 Un experto en la materia entendería que los ácidos nucleicos polimórficos que se localizan en las regiones genómicas identificadas se pueden usar en determinadas realizaciones de los procedimientos desvelados. Dadas las disposiciones en el presente documento de una región genómica, de los QTL y de los marcadores polimórficos identificados en el presente documento, se pueden obtener marcadores adicionales localizados bien en o cerca de una región genómica descrita en el presente documento que se asocian con el fenotipo caracterizando nuevos marcadores en diversos germoplasmas. La región genómica, los QTL y los marcadores polimórficos identificados en el presente documento también se pueden mapear en relación con cualquier mapa genético o físico públicamente disponible para colocar la región descrita en el presente documento sobre tal mapa. Un experto en la materia también entendería que también se pueden usar los ácidos nucleicos polimórficos adicionales que están

genéticamente ligados a los QTL asociados con una expresión de fenotipo sexual deseada y a ese mapa en 40 cM, 20 cM, 10 cM, 5 cM o 1 cM de los QTL o los marcadores asociados con la expresión del fenotipo sexual deseado.

Introgresión de un locus genómico asociado con la expresión de un fenotipo sexual deseado

5 En el presente documento se desvela un único germoplasma de sandía o plantas de sandía que comprenden una región genómica introgresada que se asocia con una expresión de fenotipo sexual deseado y el procedimiento de obtención de las mismas. La introgresión asistida por marcadores implica la transferencia de una región cromosómica, definida por uno o más marcadores, desde un germoplasma a un segundo germoplasma. La descendencia de un cruzamiento que contiene la región genómica introgresada se puede identificar mediante la combinación de marcadores característicos de la región genómica introgresada deseada de un primer germoplasma
10 (por ejemplo, el germoplasma de la expresión del fenotipo sexual deseado) y ambos marcadores ligados y no ligados característicos del fondo genético deseado de un segundo germoplasma.

15 Los marcadores que flanquean que identifican una región genómica asociada con la expresión de un fenotipo sexual deseado pueden incluir cualquiera de los loci descritos anteriormente en LG2, LG7, LG10 o LG11A; y los que identifican subregiones de la misma pueden incluir cualquiera de los loci o de los intervalos de los loci descritos anteriormente en LG2, LG7, LG10 o LG11A.

20 Por ejemplo, los marcadores que flanquean que identifican una región genómica o subregión incluyen los definidos por los loci NW0248967 (SEQ ID NO:1) y NW0248118 (SEQ ID NO:3) en el grupo de ligamiento 2 (LG2), o en 15 cM de los mismos; los loci NW0252278 (SEQ ID NO:4) y NW0248560 (SEQ ID NO:5) en el grupo de ligamiento 7 (LG7) o en 15 cM de los mismos; los loci NW0248392 (SEQ ID NO:6) y NW0248711 (SEQ ID NO:7) en el grupo de ligamiento 10 (LG10) o en 15 cM de los mismos; o los loci NW0249365 (SEQ ID NO:8) y NW0250112 (SEQ ID NO:9) en el grupo de ligamiento 11A (LG11A) o en 15 cM de los mismos.

25 En realizaciones adicionales, los marcadores se desvelan en una región genómica flanqueada por los loci NW0248967 (SEQ ID NO:1) y NW0251455 (SEQ ID NO:11) en LG2; los loci NW0248118 (SEQ ID NO:3) y NW0251455 (SEQ ID NO:11) en LG2; los loci NW0252278 (SEQ ID NO:4) y NW0249392 (SEQ ID NO:12) en LG7; los loci NW0248560 (SEQ ID NO:5) y NW0249392 (SEQ ID NO:12) en LG7; los loci NW0248392 (SEQ ID NO:6) y NW0248268 (SEQ ID NO:13) en LG10; o los loci NW0248711 (SEQ ID NO:7) y NW0248268 (SEQ ID NO:13) en LG10; o en 15 cM de los mismos.

30 Los marcadores que flanquean que están tanto en el extremo proximal del telómero como en el extremo proximal del centrómero de cualquiera de estos intervalos genómicos pueden ser útiles en una variedad de esfuerzos de cultivo que incluyen, pero sin limitación, la introgresión de regiones genómicas asociadas con la expresión del fenotipo sexual deseado en un fondo genético que comprende marcadores asociados con el germoplasma que habitualmente contiene un genotipo asociado con otro fenotipo.

35 Los marcadores que están ligados y bien inmediatamente adyacentes o bien adyacentes a los QTL de expresión del fenotipo sexual deseado identificado que permiten la introgresión del QTL en ausencia del ADN ligado extraño del germoplasma fuente que contiene los QTL se proporcionan a continuación. Los expertos en la materia apreciarán que cuando se intenta introgresar una región genómica más pequeña que comprende un QTL asociado con una expresión del fenotipo sexual deseado descrita en el presente documento, cualquiera de los marcadores proximales del telómero o proximales del centrómero que están inmediatamente adyacentes a una mayor región genómica que comprende el QTL se puede usar para introgresar esa pequeña región genómica.

40 Un marcador en aproximadamente 40 cM de un marcador de un QTL de expresión del fenotipo sexual descrito en el presente documento puede ser útil en una variedad de esfuerzos de cultivo que incluyen la introgresión de regiones genómicas asociadas con la expresión de un fenotipo sexual deseado en un fondo genético que comprende marcadores asociados con el germoplasma que habitualmente contiene un genotipo asociado con otro fenotipo. Por ejemplo, un marcador en 40 cM, 20 cM, 15 cM, 10 cM, 5 cM, 2 cM o 1 cM de un QTL de expresión de fenotipo
45 sexual o de un marcador descrito en el presente documento se puede usar para la introgresión asistida por marcadores de una expresión de fenotipo sexual deseado.

50 Un marcador en aproximadamente 40 cM de un marcador de QTL de expresión del fenotipo sexual en LG2 descrito en el presente documento se puede usar para la introgresión asistida por marcadores de expresión de fenotipo sexual deseado. Por ejemplo, un marcador en 40 cM, 20 cM, 15 cM, 10 cM, 5 cM, 2 cM o 1 cM de un marcador de QTL de expresión de fenotipo sexual en LG2 descrito en el presente documento se puede usar para la introgresión asistida por marcadores de una expresión de fenotipo sexual deseado. Tal como se describe anteriormente, un marcador de QTL de expresión de fenotipo sexual en LG2 puede incluir uno o más de NW0248967 (SEQ ID NO:1); NW0248118 (SEQ ID NO: 3); o NW0251455 (SEQ ID NO: 11).

55 Un marcador en aproximadamente 40 cM de un marcador de QTL de expresión del fenotipo sexual en LG7 descrito en el presente documento se puede usar para la introgresión asistida por marcadores de expresión de fenotipo sexual deseado. Por ejemplo, un marcador en 40 cM, 20 cM, 15 cM, 10 cM, 5 cM, 2 cM o 1 cM de un marcador de QTL de expresión de fenotipo sexual en LG7 descrito en el presente documento se puede usar para la introgresión asistida por marcadores de una expresión de fenotipo sexual deseado. Tal como se describe anteriormente, un

marcador de QTL de expresión de fenotipo sexual en LG7 puede incluir uno o más de los loci NW0252278 (SEQ ID NO:4); NW0248560 (SEQ ID NO: 5); o NW0249392 (SEQ ID NO: 12).

5 Un marcador en aproximadamente 40 cM de un marcador de QTL de expresión del fenotipo sexual en LG10 descrito en el presente documento se puede usar para la introgresión asistida por marcadores de expresión de fenotipo sexual deseado. Por ejemplo, un marcador en 40 cM, 20 cM, 15 cM, 10 cM, 5 cM, 2 cM o 1 cM de un marcador de QTL de expresión de fenotipo sexual en LG10 descrito en el presente documento se puede usar para la introgresión asistida por marcadores de una expresión de fenotipo sexual deseado. Tal como se describe anteriormente, un marcador de QTL de expresión de fenotipo sexual en LG10 puede incluir uno o más de NW0248392 (SEQ ID NO:6); NW0248711 (SEQ ID NO: 7); o NW0248268 (SEQ ID NO: 13).

10 Un marcador en aproximadamente 40 cM de un marcador de QTL de expresión del fenotipo sexual en LG11A descrito en el presente documento se puede usar para la introgresión asistida por marcadores de expresión de fenotipo sexual deseado. Por ejemplo, un marcador en 40 cM, 20 cM, 15 cM, 10 cM, 5 cM, 2 cM o 1 cM de un marcador de QTL de expresión de fenotipo sexual en LG11A descrito en el presente documento se puede usar para la introgresión asistida por marcadores de una expresión de fenotipo sexual deseado. Tal como se describe anteriormente, un marcador de QTL de expresión de fenotipo sexual en LG11A puede incluir uno o más de NW0249365 (SEQ ID NO:8); NW0250112 (SEQ ID NO: 9); o NW0250956 (SEQ ID NO: 10).

15 Las plantas de sandía o el germoplasma que comprende una región introgresada que se asocia con la expresión de un fenotipo sexual deseado en la que al menos el 10 %, el 25%, el 50%, el 75%, el 90 % o el 99 % de las secuencias genómicas restantes llevan marcadores característicos de la planta o germoplasma que de otro modo u ordinariamente comprenden una región genómica asociada con otro fenotipo, se proporcionan así. Además, también se proporcionan plantas de sandía que comprenden una región introgresada en la que las regiones estrechamente unidas adyacentes y/o inmediatamente adyacentes a las regiones genómicas, QTL, y marcadores proporcionados en el presente documento que comprenden secuencias genómicas que llevan marcadores característicos de plantas de sandía o germoplasma que de otro modo o habitualmente comprenden una región genómica asociada con el fenotipo.

Técnicas de cultivo asistido por moléculas

Los marcadores genéticos que se pueden usar en la práctica de la presente invención incluyen polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphisms*), polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP, del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphisms*), repeticiones de secuencias simples (SSR, del inglés *Simple Sequence Repeats*), polimorfismo de longitud en las secuencias discretas (SSLP, del inglés *simple sequence length polymorphisms*), polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*), polimorfismos de inserción/delección (Indels), repeticiones en tándem de número variable (VNTR) y ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD, del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*) e isozimas. El descubrimiento y el desarrollo de marcadores en cultivos proporciona el marco inicial para aplicaciones para actividades de cultivo asistidas por marcadores (Publicaciones de Patentes de Estados Unidos N.º: 2005/0204780, 2005/0216545, 2005/0218305 y 2006/00504538). El "mapa genético" resultante es la representación de la posición relativa de los loci caracterizados (marcadores de ácido nucleico polimórfico o cualquier otro locus para el que los alelos se pueden identificar) entre sí.

40 Los polimorfismos que comprenden tan poco como un solo cambio de nucleótido se pueden analizar de varias maneras. Por ejemplo, la detección se puede hacer mediante técnicas de electroforesis que incluyen un polimorfismo conformacional de cadena simple (Orita y col. (1989) *Genomics*, 8(2), 271-278), electroforesis en gel de gradiente desnaturante (Myers (1985) EPO 0273085), o polimorfismos de longitud de fragmento de escisión (Life Technologies, Inc., Gathersberg, MD 20877), pero la disponibilidad generalizada de las máquinas de secuenciación de ADN a menudo hace que sea más fácil secuenciar solo productos amplificados directamente. Una vez que se conoce la diferencia en la secuencia polimórfica, se pueden diseñar ensayos rápidos para pruebas de progenie, que típicamente implican alguna versión de amplificación por PCR de alelos específicos (PASA, Sommer, y col. (1992) *Biotechniques* 12(1), 82-87), o amplificación por PCR de múltiples alelos específicos (PAMSA, Dutton y Sommer (1991) *Biotechniques*, 11(6), 700-7002).

50 Recientemente, los mapas genéticos de polimorfismos de nucleótido único (SNP) se produjeron usando diversos parentales de *C. lanatus*, incluyendo una población producida a partir del cruzamiento de élite x élite (*C. lanatus* var. *lanatus*) y una población de un cruzamiento intersubespecífico entre una variedad de cultivo de élite y *C. lanatus* var. *ctroides* (Sandlin y col., *Theor Appl Genet* 125(8):1603-18, 2012). Tal como se describe en el presente documento, se utilizaron poblaciones de mapeo genéticamente diversas que segregan para la expresión sexual para identificar el efecto principal de los QTL (M-QTL) y el efecto epistático de los QTL (E-QTL) asociado con la expresión sexual en la sandía. Los resultados descritos en el presente documento identifican QTL en LG2, LG7, LG10 y LG11A que podrían controlar la expresión sexual en sandías.

En conjunto, los marcadores polimórficos sirven como una herramienta útil para la identificación genética de plantas para informar del grado de identidad de líneas o variedades (Patente de Estados Unidos N.º 6.207.367). Estos marcadores constituyen la base para determinar asociaciones con fenotipos y se pueden usar para dirigir la

- ganancia genética. En determinadas realizaciones de los procedimientos desvelados, se pueden usar ácidos nucleicos polimórficos para detectar, en una planta de sandía, un genotipo asociado con la expresión del fenotipo sexual deseado, para identificar una planta de sandía con un genotipo asociado con la expresión de un fenotipo sexual deseado, y para seleccionar una planta de sandía con un genotipo asociado con la expresión del fenotipo sexual deseado. En determinadas realizaciones de los procedimientos desvelados, se pueden usar ácidos nucleicos polimórficos para producir una planta de sandía que comprende en su genoma un locus introgresado asociado con la expresión del fenotipo sexual deseado. En determinadas realizaciones, se pueden usar ácidos nucleicos polimórficos para cultivar una progenie de plantas de sandía que comprenden un locus asociado con la expresión del fenotipo sexual deseado.
- 10 Determinados marcadores genéticos pueden incluir marcadores "dominantes" o "codominantes". Los marcadores "codominantes" revelan la presencia de dos o más alelos (dos por individuo diploide). Los marcadores "dominantes" revelan la presencia de solo un único alelo. Los marcadores se heredan preferentemente en la forma codominante, de manera que la presencia de ambos alelos en un locus diploide, o de múltiples alelos en loci triploide o tetraploide, sea fácilmente detectable, y no tengan variación ambiental, es decir, su heredabilidad es 1. Un genotipo de marcador típicamente comprende dos alelos de marcadores en cada locus en un organismo diploide. La composición alélica del marcador de cada locus puede ser bien homocigótica o heterocigótica. La homocigosidad es una condición en la que ambos alelos en un locus se caracterizan por la misma secuencia de nucleótidos. La heterocigosidad se refiere a diferentes condiciones del alelo en un locus.
- 15 Los análisis basados en ácido nucleico para determinar la presencia o ausencia del polimorfismo genético (es decir, para el genotipado) se pueden usar en programas de cultivo para la identificación, la selección y la introgresión. Hay disponibles una amplia variedad de marcadores genéticos para el análisis de polimorfismos genéticos y son conocidos por los expertos en la materia. El análisis se puede usar para seleccionar genes, partes de genes, QTL, alelos o regiones genómicas que comprenden o que están ligadas a un marcador genético que está ligado o que se asocia con la expresión del fenotipo sexual deseado.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, los procedimientos de análisis de ácido nucleico incluyen procedimientos de detección basados en PCR (por ejemplo, ensayos de TaqMan), procedimientos de micromatriz, procedimientos basados en espectrometría de masas y/o procedimientos de secuenciación de ácido nucleico, que incluyen la secuenciación del genoma completo. En determinadas realizaciones, la detección de sitios polimórficos en una muestra de ADN, de ARN o de ADNc se puede facilitar mediante el uso de procedimientos de amplificación de ácido nucleico. Tales procedimientos aumentan de manera específica la concentración de polinucleótidos que abarcan el sitio polimórfico, o incluyen ese sitio y las secuencias localizadas distalmente o proximalmente a él. Tales moléculas amplificadas se pueden detectar fácilmente mediante procedimientos de electroforesis en gel o de detección por fluorescencia.
- 25 Un procedimiento para lograr esta amplificación emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y col. 1986 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273; Patentes europeas 50.424; 84.796; 258.017; 237.362; 201.184; Patentes de Estados Unidos 4.683.202; 4.582.788; y 4.683.194), usando pares de cebadores que son capaces de hibridar con las secuencias proximales que definen un polimorfismo en su forma de doble cadena. También se pueden usar procedimientos para tipificar ADN basados en la espectrometría de masas. Tales procedimientos se desvelan en las patentes de Estados Unidos 6.613.509 y 6.503.710 y en las referencias halladas en esos documentos.
- 30 Se pueden detectar o tipificar polimorfismos en secuencias de ADN mediante una variedad de procedimientos eficaces bien conocidos en la materia que incluyen los desvelados en las patentes de Estados Unidos N.º: 5.468.613, 5.217.863; 5.210.015; 5.876.930; 6.030.787; 6.004.744; 6.013.431; 5.595.890; 5.762.876; 5.945.283; 5.468.613; 6.090.558; 5.800.944; 5.616.464; 7.312.039; 7.238.476; 7.297.485; 7.282.355; 7.270.981 y 7.250.252. Sin embargo, los procedimientos de la presente invención se pueden usar en conjunto con cualquier procedimiento de tipificación de polimorfismos para tipificar muestras de ADN genómico. Estas muestras de ADN genómico usadas incluyen ADN genómico aislado directamente de una planta, ADN genómico clonado o ADN genómico amplificado.
- 35 Por ejemplo, se pueden detectar polimorfismos en secuencias de ADN mediante hibridación con sondas de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO, del inglés *allele-specific oligonucleotide*) tal como se desvela en las patentes de Estados Unidos N.º 5.468.613 y 5.217.863. La patente de Estados Unidos N.º 5.468.613 desvela hibridaciones de oligonucleótidos específicos de alelo en las que se pueden detectar variaciones simples o múltiples de nucleótidos en secuencias de ácido nucleico en ácidos nucleicos mediante un procedimiento en el que se amplifica la secuencia que contiene la variación de nucleótidos, se coloca en puntos sobre una membrana y se trata con una sonda de oligonucleótidos específica de secuencia marcada.
- 40 La secuencia de ácido nucleico diana también se puede detectar mediante procedimientos de ligamiento de sonda tal como se desvela en la Patente de Estados Unidos N.º 5.800.944, en la que la secuencia de interés se amplifica y se hibrida con sondas seguido por el ligamiento para detectar una parte marcada de la sonda.
- 45
- 50
- 55

También se pueden usar micromatrices para la detección de polimorfismos, en las que los conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ensamblan de forma solapante para representar una única secuencia, de manera que una diferencia en la secuencia diana en un punto daría como resultado una hibridación parcial de la sonda (Borevitz y col., *Genome Res.* 13:513-523 (2003); Cui y col., *Bioinformatics* 21:3852-3858 (2005). Sobre una micromatriz cualquiera, se espera que haya una pluralidad de secuencias diana, que pueden representar genes y/o regiones no codificantes en las que cada secuencia diana se representa por una serie de oligonucleótidos solapantes, en lugar de por una única sonda. Esta plataforma proporciona una detección sistemática de alto rendimiento de una pluralidad de polimorfismos. La tipificación de secuencias diana mediante procedimientos basados en micromatrices se desvela en las Patentes de EE.UU. 6.799.122; 6.913.879 y 6.996.476.

La secuencia de ácido nucleico diana también se puede detectar mediante procedimientos de ligamiento a sonda tales como el desvelado en la Patente de EE.UU. N.º 5.616.464, que emplea al menos un par de sondas que tienen secuencias homólogas a partes adyacentes de la secuencia de ácido nucleico diana y que tiene cadenas laterales que se unen de manera no covalente para formar un eje tras el emparejamiento de bases de las sondas con la secuencia de ácido nucleico diana. Al menos una de las cadenas laterales tiene un grupo fotoactivable que puede formar un enlace cruzado covalente con el otro miembro de cadena lateral del eje.

Otros procedimientos para detectar SNP e Indel incluyen los procedimientos de extensión de base única (SBE, del inglés *single base extension*). Los ejemplos de los procedimientos de SBE incluyen los desvelados en las Patentes de Estados Unidos N.º 6.004.744; 6.013.431; 5.595.890; 5.762.876 y 5.945.283. Los procedimientos de SBE se basan en la extensión de un cebador de nucleótidos que está adyacente a un polimorfismo para incorporar un resto de nucleótido detectable tras la extensión del cebador. En determinadas realizaciones, el procedimiento de SBE usa tres oligonucleótidos sintéticos. Dos de los oligonucleótidos sirven como cebadores de PCR y son complementarios a la secuencia del locus del ADN genómico que flanquea una región que contiene el polimorfismo a ensayar. Tras la amplificación de la región del genoma que contiene el polimorfismo, el producto de la PCR se mezcla con el tercer oligonucleótido (denominado cebador de extensión) que está diseñado para hibridar con el ADN amplificado adyacente al polimorfismo en presencia de la ADN polimerasa y de dos didesoxinucleósido trifosfatos marcados de manera diferencial. Si el polimorfismo está presente en el molde, se puede añadir uno de los didesoxinucleósido trifosfatos marcados al cebador en una extensión de cadena de bases única. El alelo presente se infiere luego determinando cuál de los dos marcadores diferenciales se agregó al cebador de extensión. Las muestras homocigóticas darán como resultado que solo una de las dos bases marcadas se ha incorporado y, por lo tanto, solo se detectará uno de los dos marcadores. Las muestras heterocigóticas tienen ambos alelos presentes y, por lo tanto, dirigirán la incorporación de ambos marcadores (en diferentes moléculas del cebador de extensión) y, por lo tanto, se detectarán ambos marcadores.

En otro procedimiento para detectar polimorfismos, se pueden detectar SNP e Indels mediante procedimientos desvelados en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.210.015; 5.876.930 y 6.030.787 en las que una sonda que tiene un tinte reportero fluorescente en 5' y un colorante inhibidor en 3' unidos de manera covalente a los extremos 5' y 3' de la sonda. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del tinte reportero al tinte inactivador da como resultado la supresión de la fluorescencia del tinte reportero, por ejemplo, mediante transferencia de energía de tipo Förster. Durante la PCR, los cebadores directo e inverso hibridan con una secuencia específica de ADN diana que flanquea un polimorfismo mientras que la sonda de hibridación hibrida con la secuencia que contiene el polimorfismo en el producto de PCR amplificado. En el posterior ciclo de PCR, la ADN polimerasa con actividad exonucleasa 5' → 3' escinde la sonda y separa el tinte reportero del tinte inhibidor, dando como resultado un aumento de la fluorescencia del reportero.

En otra realización, el locus o los loci de interés se pueden secuenciar de manera directa usando tecnologías de secuenciación de ácido nucleico. Los procedimientos para secuenciar ácido nucleico se conocen en la materia e incluyen tecnologías proporcionadas por 454 Life Sciences (Brandford, CT), Agencourt Bioscience (Beverly, MA), Applied Biosystems (Foster City, CA), LI-COR Biosciences (Lincoln, NE), NimbleGen Systems (Madison, WI), Illumina (San Diego, CA) y VisiGen Biotechnologies (Houston, TX). Tales tecnologías de secuenciación de ácido nucleico comprende formatos tales como matrices de perlas en paralelo, secuenciación mediante ligamiento, electroforesis capilar, microplacas electrónicas, "biochips", micromatrices, microplacas en paralelo, y matrices de molécula única, tal como se revisa por R.F. Service Science 2006 311:1544-1546.

Los marcadores a usar en los procedimientos de la presente invención preferentemente deberían ser diagnósticos de origen para hacer inferencias sobre poblaciones posteriores. La experiencia hasta la fecha sugiere que los marcadores de SNP pueden ser ideales para el mapeo dado que la probabilidad de que un alelo particular de SNP provenga de orígenes independientes en las poblaciones existentes de una especie particular es muy baja. Por lo tanto, los marcadores de SNP parecen ser útiles para el seguimiento y para ayudar a la introgresión de los QTL.

Definiciones

Las siguientes definiciones se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a los expertos en la materia en la práctica de la presente invención. A menos que se indique otra cosa, los términos se entienden de acuerdo al uso convencional de los expertos en la materia relevante.

Tal como se usa en el presente documento, el término "planta" incluye células vegetales, protoplastos de plantas, células vegetales de cultivos tisulares a partir de los cuales se pueden regenerar plantas de sandía, callo de células vegetales, agregados vegetales y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas tales como polen, flores, semillas, hojas, tallos y similares.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, una sandía que tiene una "expresión del fenotipo sexual deseado" tiene uno o más rasgos de un porcentaje deseado de flores masculinas, del porcentaje de flores femeninas, del porcentaje de flores hermafroditas, y del porcentaje de femeninas del total de flores pistiladas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "población" significa una colección genéticamente heterogénea de plantas que comparten una derivación parental común.

- 10 Tal como se usa en el presente documento, los términos "variedad" y "variedad de cultivo" significan un grupo de plantas similares que, mediante su árbol genealógico su rendimiento se pueden identificar de otras variedades en la misma especie.

Tal como se usa en el presente documento, un "alelo" se refiere a una de dos o más formas alternativas de una secuencia genómica en un locus dado en un cromosoma.

- 15 Un "locus de rasgo cuantitativo (QTL)" es una localización cromosómica que codifica al menos un primer alelo que afecta a la expresividad de un fenotipo.

- 20 Tal como se usa en el presente documento, un "marcador" se refiere a una característica detectable que se puede usar para discriminar entre organismos. Los ejemplos de tales características incluyen, pero sin limitación, marcadores genéticos, marcadores bioquímicos, metabolitos, características morfológicas y características agronómicas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "fenotipo" significa las características detectables de una célula u organismo que pueden estar influenciadas por la expresión génica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "genotipo" significa la composición alélica de una planta.

- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término "introgresado", cuando se usa en referencia a un locus genético, se refiere a un locus genético que se ha introducido en un nuevo fondo genético, tal como mediante retrocruzamiento. La introgresión de un locus genético puede, por lo tanto, lograrse mediante procedimientos de cultivo de plantas y/o mediante procedimientos de genética molecular. Tales procedimientos de genética molecular incluyen, pero sin limitación, diversas técnicas de transformación de plantas y/o procedimientos que proporcionan la recombinación homóloga, la recombinación no homóloga, la recombinación específica de sitio y/o modificaciones genómicas que proporcionan la sustitución del locus o la conversión del locus.
- 30

Tal como se usa en el presente documento, el término "ligado", cuando se usa en el contexto de marcadores de ácido nucleico y/o de regiones genómicas, significa que los marcadores y/o las regiones genómicas se localizan en el mismo grupo de ligamiento o cromosoma de manera que tienden a segregarse juntos en la meiosis.

- 35 Tal como se usa en el presente documento, el término "madurez" significa madurez del desarrollo del fruto. La madurez indica el momento en el que una fruta de sandía está lista para su recolección. En las sandías, la madurez está asociada a cambios en el color de la pulpa y en el contenido de azúcar.

- 40 Tal como se usa en el presente documento, el término "denotar", cuando se usa en referencia a un genotipo vegetal se refiere a cualquier procedimiento mediante el cual se indica que una planta tiene un determinado genotipo. Esto incluye cualquier medio de identificación de una planta que tiene un determinado genotipo. La indicación de un determinado genotipo puede incluir cualquier entrada en cualquier tipo de medio escrito o electrónico o base de datos en la que se proporciona el genotipo de la planta. Las indicaciones de un determinado genotipo también pueden incluir cualquier procedimiento en el que una planta se marca o se etiqueta de forma física. Los ejemplos ilustrativos de marcado o de etiquetado físico útiles en la invención incluyen un código de barras, una identificación por radiofrecuencia (RFID) o una etiqueta.

45 **Ejemplos**

Las siguientes realizaciones desveladas son meramente representativas de la invención que se pueden realizar de diversas formas. Los ejemplos que no están dentro del alcance de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

Ejemplo 1

Materiales vegetales y mapa genético

- 50 El desarrollo de la población F₂ de *C. lanatus* var. *lanatus* x *C. lanatus* var. *citroides* se ha descrito anteriormente (Sandlin y col., Theor Appl Genet 125(8):1603-18, 2012). En resumen, se hizo un cruzamiento entre *C. lanatus* var. *lanatus* ZWRM 50 de China (ZWRM; PI 593359) y una muestra de *C. lanatus* var. *citroides* silvestre de Sudáfrica

(CTR; PI 244019). Se autopolinizó una única planta F_1 para obtener semillas de F_2 . Se genotiparon ciento ochenta y dos individuos de F_2 y se construyó un mapa genético que consiste en 338 marcadores de polimorfismo de nucleótido único (SNP) (Sandlin y col., Theor Appl Genet 125(8):1603-18, 2012).

Ejemplo 2

5 Fenotipado del rasgo

Las plantas F_2 de ZWRM x CTR y los genotipos parentales se cultivaron en el invernadero en el campus de la Universidad de Georgia en Atenas desde mayo hasta agosto de 2007. Las semillas germinaron en bandejas de plántulas y se trasplantaron cuatro semanas más tarde a macetas de vivero 14.136-L (C1600-Classic, Nursery Supplies Inc., Kissimmee, FL) rellenas con mezcla Fafard 3B (Conrad Fafard, Inc., Agawam, MA) y 12 g de Osmocote Pro (19N-2.2P-6.6K; Scotts Miracle-Gro, Marysville, OH) por maceta. La expresión sexual de las flores se registró como el número de flores femeninas, masculinas y hermafroditas en los primeros 20 nudos de la cepa principal en cada planta. Los datos de expresión sexual se convirtieron a porcentaje de masculinos (% de M), porcentaje de femeninos (% de F), porcentaje de hermafroditas (% de HM) y porcentaje de femeninos de flores pistiladas (femenino + hermafrodita) (% de F/P). Se calcularon las correlaciones de Pearson usando JMP 9.0.2 (JMP Versión 9.0.2., 2010).

Resultados: ZWRM fue monoica con el 75 % de flores masculinas y el 25 % de flores femeninas, mientras que CTR fue andromonoica con el 90 % de flores masculinas y el 10 % de flores hermafroditas (FIG. 1, y FIG. 2). El % de flores M en la población F_2 varió desde el 60 % al 95 % (FIG. 3a) e incluyó plantas monoicas (aproximadamente el 40 %), andromonoicas (aproximadamente el 30 %) y trimonoicas (aproximadamente el 30 %; masculinas, femeninas y hermafroditas) (FIG. 2b, 2c y 2d). El rasgo del % de F/P se creó en un esfuerzo por cuantificar el rasgo trimonoico. El aspecto de las flores trimonoicas en las sandías también se documentó por Rosa (Hilgardia 3:233-250, 1928). La expresión sexual en sandías parece tener un alto grado de plasticidad. Al igual que las observaciones de Rosa (Hilgardia 3:233-250, 1928), las flores hermafroditas a veces tenían solo uno o dos estambres, en lugar de tres. Las flores se puntuaron como hermafroditas si se observaba una estructura que desprendía polen, además de un ovario y un estigma.

El % de flores F en la población F_2 varió del 0 al 30 % (FIG. 2b) y el % de flores HM del 0 al 40 %. Hubo una correlación negativa (-0,41) altamente significativa ($P < 0,0001$) entre el % de flores M y el % de flores HM (FIG. 3) así como entre el % de HM y el % de F (-0,84) y el % de HM y el % de F/P (-0,96) (Tabla 1). Hubo una correlación positiva significativa entre el % de F/P y el % de masculinas (0,23) así como entre el % de F/P y el % de F (0,90). Por lo tanto, cuanto mayor es el porcentaje de flores masculinas, menor es el porcentaje de flores pistiladas hermafroditas.

TABLA 1. Correlaciones de Pearson para el porcentaje de masculinas (% de masculinas), el porcentaje de femeninas (% de femeninas), el porcentaje de hermafroditas (% de HM) y el porcentaje de femeninas del total de flores pistiladas (% de F/P) en las primeras veinte flores de la cepa principal de la población F_2 de *C. lanatus* var. *lanatus* (ZWRM; PI 593359) x *C. lanatus* var. *citroides* (CTR; PI 244019).

	% de masculinas	% de femeninas	% de HM
% de femeninas	-0,11		
% de HM	-0,41**	-0,84**	
% de F/P	0,23*	0,90**	-0,96**

* $P < 0,01$; ** $P < 0,0001$

Ejemplo 3.

Detección de los QTL

Dado que los datos de expresión sexual se expresaron como porcentajes, los datos se transformaron en la raíz cuadrada del arcoseno antes de que se realizase el análisis de los QTL (Sokal y Rohlf, W. H. Freeman y colaboradores, Nueva York, NY, 1995; Wills y col., J Hered 101:727-736, 2010).

El análisis para la detección de los QTL se realizó usando WinQTL Cartographer (WinQTL Cart) versión 2.5 (Wang y col., Windows QTL Cartographer 2.5, Departamento de Estadística, Universidad del Estado de Carolina del Norte, Raleigh, NC, 2011). Los QTL se identificaron usando el mapeo por intervalos compuestos (CIM, del inglés *composite interval mapping*) (Zeng, PNAS, EE.UU. 90:10972-10976, 1993; Zeng, Genetics 136:1457-1468, 1994) y la significación se determinó usando ensayos de permutación (1.000 permutaciones, $\alpha = 0,05$) (Churchill y col., Genetics 138:963-971, 1994; Doerge y col., Genet Mol Biol 142:285-294, 1996). Se usó el modelo estándar (Modelo 6) con una velocidad de paso de 1 cM para el análisis de CIM.

Resultados: Se mapearon nueve QTL asociados con la expresión sexual en cuatro grupos de ligamiento diferentes (Tabla 2, FIG. 3) para los rasgos de % de M, % de F, % de HM y % de F/P. Estos QTL se colocaron en cuatro regiones en los LG 2, 7, 10 y 11A. El porcentaje de variación fenotípica explicada varió del 5,7 % (LG 10) al 37,7 % (LG 11A) y el intervalo de soporte de LOD-1 para los QTL varió desde 4,4 cM (LG 11A) hasta 19,4 cM (LG 2). Se

colocalizaron tres QTL para el % de M, el % de F, el % de HM y el % de F/P en LG 11A y explicaron el 8,5 %, el 37,3%, el 31,3 % y el 33,4 % de la variación fenotípica para los rasgos, respectivamente. Se ha documentado una correlación entre la forma del fruto y las flores pistiladas frente a las hermafroditas en sandías, pepinos y melones (Loy, Cucurbit Genet Coop Rpt (2005-2006) 28-29:12-13, 2006; Poole y col., J Agr Res 71:533-552, 1945; Rosa, Hilgardia 3:233-250, 1928). En el melón, El gen *a*, junto con el gen *p* (que controla el número de carpelos) afectan a la forma del fruto (Abdelmohsin y col., en: Pitrat, M. (ed.), Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae, INRA, Avignon. Francia, 2008; Fernandez-Silva y col., Theor Appl Genet 121:931-940, 2010; Monforte y col., Theor Appl Genet 108:750-758, 2004; Périn y col., Mol Gen Genom 266:933-941, 2002). Si tal efecto pleiotrópico también está presente en las sandías, cabría esperar que el gen *a* se localizase en una región similar como los QTL que controlan la forma del fruto. Los datos del índice de la forma del fruto (FSI, del inglés *fruit shape index*) para la población estaban disponibles de un estudio previo (Sandlin y col., Theor Appl Genet 125(8):1603-18, 2012) y la correlación entre el FSI y el % de HM demostró una correlación significativa ($P < 0,0001$, $r = -0,38$). Se ha documentado un QTL principal de la forma del fruto en la población ZWRM x CTR a 20,4 cM desde la parte superior del LG 11A (FIG. 3) y explica el 31,8 % de la variación fenotípica de este rasgo (Sandlin y col., Theor Appl Genet 125(8):1603-18, 2012). Este QTL de la forma del fruto se solapa con el QTL principal de expresión sexual identificado en el presente estudio (FIG. 3). Por lo tanto, se sugiere que el QTL principal de LG11A es la localización del gen *a* responsable del carácter andromonoico en sandías.

Además de los loci colocalizados en LG11A, se identificaron otras tres localizaciones de QTL asociadas con la expresión sexual. Se identificaron dos QTL para el % de HM y el % de F en LG 2 y LG 10 y explicaron el 7,3 % y el 7,7 % de la variación fenotípica de estos rasgos, respectivamente. Se identificó otro QTL en LG7 y explicó el 9,1 % de la variación fenotípica en el % de flores M. Por lo tanto, parece que cuatro regiones cromosómicas están contribuyendo a la expresión sexual en sandías, siendo cada rasgo (% de HM, % de F o % de M) controlado por un gen principal (*a11.1*) y un gen modificador.

TABLA 2. Regiones genómicas asociadas con el porcentaje de masculinas (% de masculinas), el porcentaje de femeninas (% de femeninas), el porcentaje de hermafroditas (% de HM) y el porcentaje de femeninas del total de flores pistiladas (% de F/P) en las primeras veinte flores de la cepa principal de la población F₂ de *C. lanatus* var. *lanatus* (ZWRM; PI 593359) x *C. lanatus* var. *citroides* (CTR; PI 244019).

Rasgo	LG ^z Cr ^y	Marcador más cercano ^x	Posición (cM)	LOD	R ² (%)	Efecto aditivo ^y	Efecto de dominancia ^y	Intervalo de soporte de LOD-1 (cM)	Intervalo de soporte de LOD-1 (cM)
% de HM	2 6	NW0251455	11,0	3,71	7,3	0,082	-0,013	0,6	20,0
% de F/P	2 6	NW0251455	9,0	3,77	6,3	-0,233	-0,066	0,0	18,0
% de masculinas	7 1	NW0249392	63,3	3,80	9,1	0,016	-0,038	59,9	66,2
% de femeninas	10 10	NW0248268	40,8	4,76	7,7	0,077	-0,008	37,3	43,8
% de F/P	10 10	NW0248268	40,8	3,79	5,7	0,237	-0,014	37,4	43,8
% de masculinas	11A 3	NW0250956	26,5	3,57	8,5	0,033	-0,003	23,7	31,5
% de femeninas	11A 3	NW0250956	24,4	19,88	37,7	0,160	0,093	21,6	26,0
% de HM	11A 3	NW0250956	28,5	15,88	31,3	-0,165	-0,061	26,5	30,9
% de F/P	11A 3	NW0250956	24,4	18,45	33,4	0,562	0,262	22,0	28,7

^z Grupo de ligamiento tal como se describe en Sandlin y col. (Theor Appl Genet 125(8):1603-18, 2012); ^y Cromosoma de la secuencia preliminar del genoma de sandía (Ren y col., 2012; The International Watermelon Genome Initiative, <http://www.wgij.org/>); ^x Información de la secuencia del marcador disponible en Sandlin y col. (Theor Appl Genet 125(8):1603-18, 2012);

^yBasado en los datos transformados en la raíz cuadrada del arco seno

Ejemplo 4.**Genes candidatos**

La búsqueda en BLAST (Altschul y col., Nucl Acids Res 25:3389-3402, 1997) del genoma preliminar de sandía (The International Watermelon Genome Initiative, www.iwgi.org) se usó para determinar si los ortólogos en sandías de los genes de expresión sexual identificados previamente en melón o en pepino se localizaban cerca de las regiones de los QTL identificados. Se usaron las siguientes secuencias de melón y de pepino: el locus F [*CsACS1* (DQ839410) y *CsACS1G* (DQ839406)] (Knopf y col., Plant Cell Physiol 47:1217-1228, 2006; Trebitsh y col., Plant Physiol 113, 1997), los loci *M* y *A* [*CsACS2* (D89732) y *CmACS-7* (EU791280 y EU791279)] (Boualem y col., Science 321:836-838, 2008; Boualem y col., PLoS ONE 4:e6144, 2009) y el locus G [*CmWIP1* (GQ870274 y GQ870275)] (Martin y col., Nature 461:1135-1138, 2009). Se hizo lo mismo para los genes *CitACS1-4* (EF154455, EF154456, EF154457 y EF154458) identificados anteriormente en sandías (Salman-Minkov y col., Plant Cell Physiol 49:740-750, 2008). Las secuencias de los marcadores de SNP (Sandlin y col., Theor Appl Genet 125(8):1603-18, 2012) más cercanos a los QTL (Tabla 2) se usaron para determinar la localización aproximada de los QTL en la secuencia preliminar del genoma.

Resultados: Tres de los QTL identificados se localizan en el mismo cromosoma de sandía como secuencias homólogas a los genes de ACS. El marcador (NW0250956) ligado a los QTL principales en LG 11A se localiza aproximadamente a 0,6 Mb de *Cla011230*, homólogos (E-valor: 0,0) a *CsACS2* y *CmACS-7* (Boualem y col., Science 321:836-838, 2008; Boualem y col., PLoS ONE 4:e6144, 2009) en el cromosoma 3 de la secuencia preliminar del genoma de sandía (The International Watermelon Genome Initiative, www.iwgi.org; Ren y col., PLoS ONE 7:e29453, 2012). *Cla011230* también presenta una alta similitud (E-valor: 0,0) con el gen *CitACS4* anteriormente clonado de manera parcial en un individuo que se origina a partir de un cruzamiento entre *C. colocynthis* y *C. lanatus* var. *lanatus* (Salman-Minkov y col., Plant Cell Physiol 49:740-750, 2008). Salman-Minkov y col. (Plant Cell Physiol 49:740-750, 2008) informaron de que la transcripción de *CitACS4* no se observa ni en tejidos florales ni vegetativos, y sugirieron que la expresión de *CitACS4* podría estar por debajo del nivel de detección con la metodología seguida, o que el gen no es funcional. Con el fin de elucidar el posible papel de *Cla011230* en la expresión sexual en sandías, los presentes inventores están actualmente en el procedimiento de clonación del gen completo en ZWRM y CTR, los parentales de la población actual de mapeo, así como en otras muestras y variedades de cultivo de *C. lanatus*.

Los genes *CsACS1* y *CsACS1G* (Knopf y col., Plant Cell Physiol 47:1217-1228; Trebitsh y col., Plant Physiol 113, 1997) presentan homología (E-valor 0,0) con el gen *Cla014057* en el cromosoma 1 de la secuencia preliminar de sandía. Sin embargo, el marcador NW0249392, ligado a los QTL está aproximadamente a 7,7 Mb de *Cla014057* en el cromosoma 1. El efecto de *CsACS1* y *CsACS1G* en la expresión sexual de pepino se debe al fenómeno de duplicación (Knopf y col., Plant Cell Physiol 47:1217-1228, 2006) y queda por ver si el gen se duplica en cualquier variedad de cultivo/muestra de sandía. *Cla014057* presenta homología con *CitACS2* (Salman-Minkov y col., Plant Cell Physiol 49:740-750, 2008), que se aisló de un cruzamiento interespecífico entre *C. colocynthis* y *C. lanatus* var. *lanatus*.

Otro homólogo de ACS (*CitACS3*) clonado en la progenie del cruzamiento interespecífico de *Citrullus* por Salman-Minkov y col. (Plant Cell Physiol 49:740-750, 2008) se localiza en el cromosoma 6 de la secuencia preliminar del genoma (*Cla006634*), y a aproximadamente 0,3 Mb del marcador NM0251455 (LG 2). El gen *CitACS3* se expresó en brotes masculinos y hermafroditas, pero no en brotes femeninos (Salman-Minkov y col., Plant Cell Physiol 49:740-750, 2008). El papel de los genes ACS en la expresión sexual de melón y de pepino los convierten en los principales genes candidatos para la expresión sexual en sandías, así como de otros cultivos de cucurbitáceas (Boualem y col., Science 321:836-838, 2008; Boualem y col., PLoS ONE 4:e61444:e6144, 2009; Knopf y col., Plant Cell Physiol 47:1217-1228, 2006; Li y col., Genetics 182:1381-1385, 2009; Trebitsh y col., Plant Physiol 113, 1997).

La localización de los genes ACS cercana a los QTL asociados a la expresión sexual en sandías indica que es probable que estos genes estén implicados en la expresión sexual. Cabe señalar, que el papel del etileno en la expresión sexual en sandía parece ser diferente del melón y el pepino (en los que el etileno promueve las flores femeninas), lo que indica que pueden estar implicados genes adicionales. Sin embargo, los datos fuertemente indican que los genes ACS son los genes candidatos más obvios para la expresión sexual en sandías.

Aunque se sabe que las condiciones ambientales, incluyendo el crecimiento de plantas en un invernadero, así como otros factores (por ejemplo, el conjunto de frutos) desempeñan un papel en la expresión sexual en sandías (Grumet y col., en: Wang, Y.-H., Behera, T. K., y Kole, C. (eds.), Genetics, genomics and breeding of cucurbits. Science Publishers, Enfield, NH, 2012; Robinson y col., Cucurbits. CAB International Publishing, Wallingford, Reino Unido, 1997; Rudich y col., Scientia Hort 5:339-344, 1976), queda por ver si los QTL comunicados en el presente documento serán estables en otras poblaciones y ambientes. Sin embargo, la colocalización de los principales QTL asociados con el % de HM con un QTL de la forma del fruto en sandías y un gen con alta similitud con el gen andromonoico identificado en otras cucurbitáceas mantiene los resultados comunicados en el presente documento.

Se identificaron los QTL asociados con la expresión sexual en sandías, incluyendo unos QTL principales (LG11A) que los inventores proponen que es la localización del gen a responsable del carácter andromonoico en la especie. La presente investigación es un paso importante hacia el uso de la selección asistida por marcadores, así como de

ES 2 671 940 T3

la posible clonación de los genes responsables de la expresión sexual en sandías.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Seminis Vegetable Seeds, Inc.

< 120 > PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA LA EXPRESIÓN SEXUAL EN SANDÍAS

5 <130> SEMB:010EP

<140> Desconocido
<141> 04/12/2013

<150> US 61/733.344
<151> 04/12/2012

10 <160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 121
<212> ADN
15 <213> Citrullus lanatus

<220> _
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es a, c, g, o t

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n es a, c, g, o t

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (105)..(105)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 1

	t g t t g t t a a a a n g a a a n c a g a t a g g g g t a g g g t a g c c g a c a g a t t g c a a c a g t t t g c t g	60
	y c c a g t g t t a t t a a a g c c a c a c c t a g g c a t g g t t t c c a a a a a a n g t g t t g a a a a g t g a c	120
	g	121

30 <210> 2
<211> 121
<212> ADN
<213> Citrullus lanatus

<400> 2

	t a t g t a g t a g a t a c a t t a g t c c a g g g a t g t a a t g t a c c t a g g c g a g a c t t t a c t a a t t c c	60
	r g t g c g g g c c a a c a g a t g a c a c g g g g a a c c a g g a g a t g g t g a a t c a c t a t t a g g t g a a g t	120
	t	121

35 <210> 3
<211> 121
<212> ADN
<213> Citrullus lanatus

40 <400> 3

ES 2 671 940 T3

atgcacatcc aaccctgtct gaggtgcttg atgaactatt taaatcagcc aaggtcagtt 60
 yaacatTTTT gtagatcatg cttgacctac aagactagtt cctatgtcaa tggaatccaa 120
 c 121
 <210> 4
 <211> 120
 <212> ADN
 5 <213> Citrullus lanatus
 <400> 4
 ggattatttg ggtcctttaa cttcaagtgg gtggagtagg ctattatagc tttgagactc 60
 ygattataat tgttagtggt ttcaactatt ataacctaca actaactaca atattactgt 120
 <210> 5
 <211> 121
 10 <212> ADN
 <213> Citrullus lanatus
 <400> 5
 tcgagcaaat gaagagtatg gctggaaaac ataaagatga ttctggtgaa ggttcggagc 60
 stacttcgca gatcaaactg acggtggacg agttcgaatc attgagcaga aaggtcagag 120
 a 121
 <210> 6
 15 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Citrullus lanatus
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (79).. (79)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 6
 aataatattt taaagggaca acgcatctga tggctagctt ttgcgtttct ccttattaat 60
 waaggagtct tgataaaanc aatctttcaa tctttaaactc ttcttgagaa ttaggatcgc 120
 g 121
 <210> 7
 25 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Citrullus lanatus
 <400> 7
 ctatagtgca gctgcacgtc cgcaaccggc tctatatttt ctacgagcag attctagctt 60
 ygaacctcat cgaaaatgcg tccaatcttg atgaaaggcc atgaacggcc attaactttc 120
 c 121
 30 <210> 8
 <211> 121
 <212> ADN
 <213> Citrullus lanatus

ES 2 671 940 T3

<400> 8
agattaccga ttaataacta ggcaacattg gcttgcccat tgcttgttat ggttccaggc 60
maacctggcc gcacaccata tttagttatt ttatcgattt ctttcttga cttacttct 120
t 121
<210> 9
<211> 121
5 <212> ADN
<213> Citrullus lanatus
<400> 9
cagactgttg gcaaatattg tttggcacct ccatttcgag atagaaagct gtttagcaag 60
stgttatattt catcacacta cagaatattt ggttgaaaag gaactagaga atgtctcatg 120
a 121
<210> 10
10 <211> 121
<212> ADN
<213> Citrullus lanatus
<220>
15 <221> misc_feature
<222> (98)..(98)
<223> n es a, c, g, o t
<220>
20 <221> misc_feature
<222> (112)..(113)
<223> n es a, c, g, o t
<400> 10
tcctgcgcat cctatcagga cctccactca tggagatggc ggagaggggt gggagagcgg 60
maagcacagg gcagttgagt ttcaggcatt tgaagaanga aagtgatggt gnnaatgaag 120
g 121
<210> 11
25 <211> 120
<212> ADN
<213> Citrullus lanatus
<220>
30 <221> misc_feature
<222> (94)..(95)
<223> n es a, c, g, o t
<220>
35 <221> misc_feature
<222> (99)..(99)
<223> n es a, c, g, o t
<400> 11
tgagataaga tgggatgatc acgggatgac tcagcttttg ttcaaagctt ccacctattt 60
kctattctat tttccttaat ttgtttaaaa aatnntcnt ctatattttc gaaaattaca 120
<210> 12
<211> 121

ES 2 671 940 T3

<212> ADN
 <213> Citrullus lanatus

 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (34)..(34)
 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (38)..(38)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 12

 aataaggtga aaggactaga ccagggttta agcnaaantc ctggagctac tcaagcatcc 60
 maaccccatc atggaaacct tggcaaaggt ggctgaagag taccgccgagg gtagccggcg 120
 t 121

 <210> 13
 <211> 121
 15 <212> ADN
 <213> Citrullus lanatus

 <400> 13

 ctgatcattc ccaaaacttc ggtttgtctc ttgagaacctc tgagcttctc ccggttggca 60
 rggatgaatt tgtttgccaa acttctcaag ttcttgcact tcattttggg catgatagtc 120
 t 121

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección, en al menos una planta de sandía, de un genotipo asociado con la expresión del fenotipo sexual de ZWRM línea PI593359 de aproximadamente el 100 por ciento femeninas del total de flores pistiladas, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 (i) detectar en al menos una planta de sandía un alelo que se asocia con la expresión sexual del fenotipo, en la que el alelo comprende la región genómica flanqueada por los loci NW0248967 (SEQ ID NO:1) y NW0248118 (SEQ ID NO:3) sobre el grupo de enlace 2 (LG2) hallado en ZWRM línea PI593359, y
(ii) seleccionar al menos una planta de sandía que posee dicho alelo de ZWRM línea PI593359.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que un ácido nucleico polimórfico se localiza en una región genómica flanqueada por:
- los loci NW0248967 (SEQ ID NO:1) y NW0251455 (SEQ ID NO:11) en LG2; o
los loci NW0248118 (SEQ ID NO:3) y NW0251455 (SEQ ID NO:11) en LG2.

FIG. 1

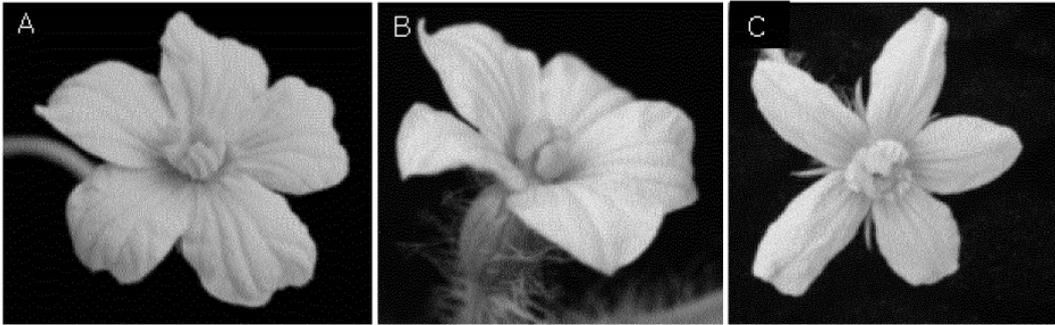


FIG. 2

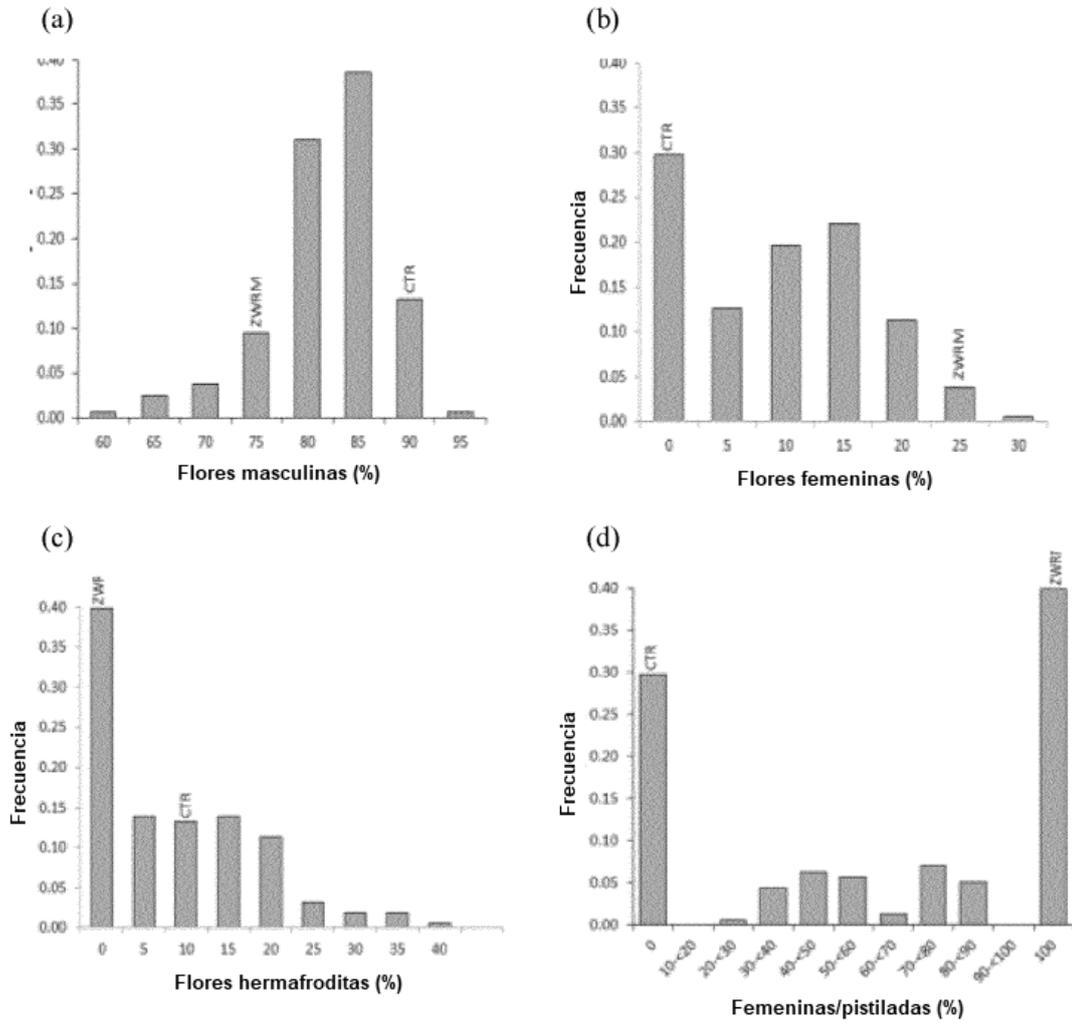


FIG. 3

