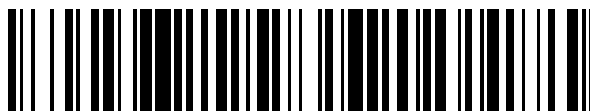


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 672**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6895 (2008.01)

A01H 5/08 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2012** **PCT/US2012/053476**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013** **WO13033611**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2012** **E 12827082 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019** **EP 2750495**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para la firmeza de la sandía**

30 Prioridad:

31.08.2011 US 201161529667 P

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

17.10.2019

73 Titular/es:

SEMINIS VEGETABLE SEEDS, INC. (100.0%)
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, MO 63167, US

72 Inventor/es:

BACHLAVA, ELENI;
JUAREZ, BENITO;
KING, JOSEPH J.;
MILLS, JEFFREY M. y
WENTZELL, ADAM M.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 727 672 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 firmeza de la sandía

Antecedentes de la invención

- La sandía [*Citrullus lanatus*], es un importante miembro comercial de la familia de las Cucurbitáceas. Las frutas presentan un amplio intervalo de coloración de la piel externa. El color en el tejido comestible varía desde diferentes tonos de rojo a naranja hasta de amarillo a blanco. Se puede encontrar en el mercado una variación adicional con tipos con semillas y sin semillas. A diferencia de la coloración de la carne - que se produce variando los loci genéticos- la distinción entre las variedades con semillas y sin semillas se producen habitualmente variando los niveles de ploidía.
- Se sabe que hay una correlación entre el nivel de ploidía y la firmeza de la carne. (Publicación de Solicitud de patente de EE. UU. 2010/00306883). Las líneas diploides normalmente tienen los niveles de firmeza de la carne más bajos. Por razones que no están claras, el procedimiento de cambio de una línea diploide a una línea tetraploide se correlaciona con una carne de la fruta más firme, y, por lo tanto, las líneas tetraploides normalmente tienen una carne de la fruta más firme que las diploides. Las triploides, que son un cruce entre una tetraploide y una diploide, tienen un nivel intermedio de firmeza de la fruta.
- Hay una demanda creciente de los consumidores en el negocio de productos frescos de productos que combinen calidad y preparación. Ejemplos de productos que cumplen estos criterios incluyen las mini-zanahorias y los cultivos de hoja, como la lechuga y las espinacas envasadas. De manera similar, existe una demanda de frutas maduras cortadas, como la sandía, melón, mango, piña, papaya y kiwi. En las sandías, un criterio de calidad para el consumidor es el dulzor. El dulzor se puede estimar midiendo los sólidos solubles totales o Brix, utilizando un refractómetro. Además, se han establecido los niveles de calidad convencionales de la fruta para los niveles de Brix (Niveles convencionales en Estados Unidos para los grados de la sandía, Departamento de Agricultura de EE. UU: (1978)). De acuerdo con estos niveles convencionales, las partes comestibles de la fruta que no tienen menos de 8 Brix se consideran que son "Buenas" mientras que las partes comestibles de la fruta que no tienen menos de 10 Brix se consideran que son "Muy Buenas".
- Un segmento en crecimiento de las ventas de sandía al menor es el que ofrece al consumidor fruta que está cortada y se presentan con la piel, o fruta con la piel quitada y en la que la carne comestible está cortada en trozos pequeños. El término de la industria para estos productos es "procesados mínimamente". En 1998, Perkins-Veazie y col. [(1998) Hortscience 33:605] estimaban que el 10 % del mercado de sandía al menor era de procesados mínimamente.
- Además de ofrecer comodidad al consumidor, una ventaja de presentar la fruta cortada es que el consumidor puede inspeccionar visualmente la calidad de la fruta, y en particular, juzgar si la fruta está madura y lista para consumir. A menudo, la fruta no madura no será uniforme en pigmentación, y la fruta pasada presentará signos de deterioro.
- La desventaja del minorista que produce productos de sandía que se presentan procesados mínimamente es que la fruta cortada tiene una vida de almacenamiento corta. Los estudios sugieren que los productos procesados mínimamente tienen una vida de almacenamiento corta de aproximadamente 2 a 3 días como máximo (*ibidem*; Wehner y col. En: Watermelons: Characteristics, Production and Marketing. Maynard, editor. ASHS Press, Alexandria VA 2001).
- La sandía disponible actualmente normalmente tiene un deterioro de su calidad rápido después de cortarse. El deterioro se manifiesta como exudación de jugo; en algunas variedades la carne de una sandía recién cortada se vuelve poco atractiva para el consumidor rápidamente. El corte de la fruta también produce deterioro, que se observa como un ablandamiento de la textura de la fruta. El rápido deterioro de la sandía cortada impone limitaciones de tiempo y espacio al minorista. Debido a que el corte de la fruta tiene una vida de almacenamiento corta, el minorista lleva a cabo normalmente el procesamiento en el lugar de venta, y tiene que controlar los productos a menudo para asegurarse que se desechen los productos deteriorados.
- A diferencia de los niveles convencionales de dulzor establecidos por el Departamento de Agricultura de EE. UU., hay convenciones no industriales para describir la firmeza de las partes comestibles de la sandía. Por lo tanto, existe un amplio intervalo de descriptores en uso, tal como "firme" y "crujiente" (catálogo de descriptores Erma Zaden para las variedades Gil 104 y Erma 12), "carne muy firme" por Zhang y col. (Publicaciones de patente de EE. UU. 2004/0060085 y 2003/0217394) y por Seminis Vegetable Seeds, Inc. en su catálogo de sandías para describir la variedad Cooperstown. Seminis ha descrito también los cultivares Fenway, Royal Star, y Sentinel como que son "excelentemente crujientes", "de carne firme" y "carne crujiente jugosa", respectivamente. Rogers Seed Company anuncia la Tri-X Brand 626 como "excepcionalmente firme" y la Tri-X Brand 313 como que tiene una "textura firme" y "carne crujiente".
- Aunque la terminología de los anuncios que se utiliza para describir la firmeza de la carne de sandía es bastante variable, las mediciones cuantitativas muestran que el germoplasma comercial tenía anteriormente una firmeza de la fruta baja. Por lo tanto, existe la necesidad en el mercado de líneas de sandía que produzcan frutos que tengan una

vida de almacenamiento más larga cuando se procesan.

Sumario de la invención

Se desvelan en el presente documento plantas de sandía con un fenotipo de carne ultra-firme y su progenie. En ciertas realizaciones, se proporcionan procedimientos que incluyen la identificación y selección de dichas plantas.

- 5 Dichas plantas comprenden un locus alélico introducido - localizado en una región genómica flanqueada por los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18) - que está asociado con el fenotipo de carne de sandía ultra-firme. La presente invención proporciona un procedimiento de detección en al menos una planta de sandía de un genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme que comprende la detección en al menos una planta de sandía de un alelo de al menos un ácido nucleico polimórfico que está unido genéticamente a un QTL asociado con un tipo de carne de sandía firme y los mapas dentro de los que se asocia con un fenotipo de carne de sandía firme, en los que dicho QTL asociado con un fenotipo de carne de sandía firme está en una región genómica flanqueada por los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18).

- 15 Ciertas realizaciones del procedimiento incluyen la identificación de una planta de sandía con un genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme. Dichos procedimientos incluyen la detección del genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme en una planta de sandía como se ha descrito anteriormente. En ciertas realizaciones el ácido nucleico polimórfico se detecta en una región genómica flanqueada por los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18), o en una subregión de la misma como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, se selecciona al menos un ácido nucleico polimórfico de entre el grupo que consiste en NW0248953 (SEQ ID NO: 2), NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248949 (SEQ ID NO: 4), 20 NW0248646 (SEQ ID NO: 5), NW0249077 (SEQ ID NO: 6), NW0249132 (SEQ ID NO: 7), NW0252494 (SEQ ID NO: 8), NW0248163 (SEQ ID NO: 9), NW0252274 (SEQ ID NO: 10), NW0248905 (SEQ ID NO: 11), NW0251011 (SEQ ID NO: 12), NW0248869 (SEQ ID NO: 13), NW0251470 (SEQ ID NO: 14), NW0251308 (SEQ ID NO: 15), NW0250718 (SEQ ID NO: 16) y NW0248059 (SEQ ID NO: 17).

- 25 Una planta de sandía que se identifica como que tiene un genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme puede decirse que comprende un genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme. Una planta de sandía, tal como la planta de sandía antedicha, que comprende un genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme, se puede seleccionar entonces de entre una población de plantas.

- 30 Se desvela adicionalmente en el presente documento un procedimiento de producción de una planta de sandía que tiene en su genoma un locus introducido asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme. Una planta de sandía que carezca del locus asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme se cruza con una segunda planta de sandía que comprende: (A) un alelo de al menos un ácido nucleico polimórfico que se asocia con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme localizado en una región genómica flanqueada por los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18) (o en una subregión de la misma como se describe en el presente documento), y (b) al menos un locus polimórfico adicional localizado fuera de la región que no está presente en dicha primera planta de sandía. A partir de este cruce, se obtiene una población de plantas de sandía que segregan el locus polimórfico que se asocia con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme y el locus polimórfico adicional. El locus polimórfico que se asocia con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme se detecta en al menos una planta de sandía de la población. Entonces se puede seleccionar una planta de sandía que tenga el locus asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme que carezca del locus polimórfico adicional, obteniendo de esta manera una 40 planta de sandía que comprende en su genoma al menos un alelo introducido de un ácido nucleico polimórfico asociado con un fenotipo de carne de sandía firme. Se puede seleccionar al menos un ácido nucleico polimórfico de entre el grupo que consiste en NW0248953 (SEQ ID NO: 2), NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248949 (SEQ ID NO: 4), NW0248646 (SEQ ID NO: 5), NW0249077 (SEQ ID NO: 6), NW0249132 (SEQ ID NO: 7), NW0252494 (SEQ ID NO: 8), NW0248163 (SEQ ID NO: 9), NW0252274 (SEQ ID NO: 10), NW0248905 (SEQ ID NO: 11), NW0251011 (SEQ ID NO: 12), NW0248869 (SEQ ID NO: 13), NW0251470 (SEQ ID NO: 14), NW0251308 (SEQ ID NO: 15), 45 NW0250718 (SEQ ID NO: 16) y NW0248059 (SEQ ID NO: 17).

- Se desvela adicionalmente en el presente documento un procedimiento de cruzamiento de plantas de sandía. Se selecciona al menos una sandía que comprenda al menos un alelo de un ácido nucleico polimórfico que esté unido genéticamente a un QTL que esté flanqueado por los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18) y asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme. Esta planta de sandía se cruza entonces con sí misma o una segunda planta de sandía para producir una progenie de plantas de sandía que tenga un QTL asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme. Se puede seleccionar el al menos un ácido nucleico polimórfico que está unido genéticamente al QTL de entre el grupo que consiste en NW0248953 (SEQ ID NO: 2), NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248949 (SEQ ID NO: 4), NW0248646 (SEQ ID NO: 5), NW0249077 (SEQ ID NO: 6), NW0249132 (SEQ ID NO: 7), NW0252494 (SEQ ID NO: 8), NW0248163 (SEQ ID NO: 9), NW0252274 (SEQ ID NO: 10), NW0248905 (SEQ ID NO: 11), NW0251011 (SEQ ID NO: 12), NW0248869 (SEQ ID NO: 13), NW0251470 (SEQ ID NO: 14), NW0251308 (SEQ ID NO: 15), NW0250718 (SEQ ID NO: 16) y NW0248059 (SEQ ID NO: 17).

- 60 Se desvela adicionalmente en el presente documento un procedimiento para la introducción de un alelo en una planta de sandía. Se proporciona una población de plantas de sandía a partir de la cual al menos en una planta de sandía se halla el genotipo con respecto a al menos un ácido nucleico polimórfico localizado en una región genómica

flanqueada por los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18). Entonces se selecciona al menos una planta de sandía de entre la población en la que la planta de sandía tiene al menos un alelo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme. Se selecciona al menos un ácido nucleico polimórfico de entre el grupo que consiste en NW0248953 (SEQ ID NO: 2), NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248949 (SEQ ID NO: 4), NW0248646 (SEQ ID NO: 5), NW0249077 (SEQ ID NO: 6), NW0249132 (SEQ ID NO: 7), NW0252494 (SEQ ID NO: 8), NW0248163 (SEQ ID NO: 9), NW0252274 (SEQ ID NO: 10), NW0248905 (SEQ ID NO: 11), NW0251011 (SEQ ID NO: 12), NW0248869 (SEQ ID NO: 13), NW0251470 (SEQ ID NO: 14), NW0251308 (SEQ ID NO: 15), NW0250718 (SEQ ID NO: 16) y NW0248059 (SEQ ID NO: 17).

Se desvela adicionalmente en el presente documento una planta de sandía obtenida por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento capaz de producir una planta de sandía tal como por producción, cruce o introducción o una planta de la progenie de la misma. Una parte de dicha planta que incluye el polen, un óvulo, una hoja, un embrión, una raíz, una punta de una raíz, una antera, una flor, un fruto, un tallo, un brote, una semilla, un protoplasto, una célula o también se contempla un callo de la planta. También se contempla la semilla de una planta de sandía obtenida por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento capaz de producir una planta de sandía tal como por producción, cruce o introducción o una semilla de la progenie de la misma.

Se desvela adicionalmente en el presente documento una sonda o cebador de ácido nucleico aislado que se hibrida en condiciones de 5 x SSC, un 50 % de formamida, y a 42 °C con una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-18 o un fragmento del mismo que contenga una variante alélica específica. La sonda o cebador pueden tener al menos 12 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido aislado puede comprender una molécula de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, y 18, y cualquier variante alélica específica de las mismas. Un oligonucleótido aislado puede comprender un fragmento de ácido nucleico con las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 18, que contenga una variante alélica específica de las mismas y que tenga al menos 12 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido aislado puede comprender un fragmento de ácido nucleico con las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, o que contenga una variante alélica específica de las mismas, en el que el fragmento que contiene dicha variante alélica tiene al menos 15, al menos 18, al menos 20, al menos 22, al menos 25 o al menos 30 nucleótidos de longitud.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. La Figura 1 muestra las distribuciones de los fenotipos de firmeza en tres entornos ensayados (Ensayo de Año 1 y Ensayo de Año 3 en Woodland, CA; Ensayo de Año 1 en Tifton, GA).

Figura 2. La Figura 2 muestra el QTL de mayor firmeza identificado en el grupo de unión 9 (del mapa genético de la población derivada de 03LB3378-1 x WAS-35-2438) y el QTL co-localizado, para el contenido en Brix y licopeno identificado utilizando el Cartografiador de QTL. Las barras negras muestran las curvas de QTL correspondientes a los intervalos de confianza de 2-LOD y los cuadrados blancos en cada barra identifican los picos de QTL.

Figura 3. Mayor QTL de firmeza identificado en el grupo de unión 9 utilizando Rqtl. **A.** El gráfico muestra la superposición de las curvas de LOD de barridos genómicos de QTL sencillo llevados a cabo mediante procedimientos de mapeo de intervalo 3 (algoritmo EM), regresión de Haley-Knott e imputaciones múltiples para los grupos de unión 19 del mapa genético 03LB3387 x WAS-35-2438. **B.** El gráfico caliente se corresponde con dos barridos genómicos de dos-QTL y muestra el efecto principal de la firmeza identificada en el grupo de unión 9 por debajo de la diagonal y la carencia de dos interacciones epistáticas de dos locus por encima de la diagonal.

Descripción detallada

I. Definiciones

Las siguientes definiciones se proporcionan para guiar a los expertos en la técnica en la práctica de la presente invención. A menos de que señale otra cosa, los términos se tienen que entender de acuerdo con el uso convencional de los expertos habitados en la técnica relevante.

Como se utiliza en el presente documento, el término "planta" incluye las células vegetales, protoplastos vegetales, células vegetales de un cultivo tisular de las que se pueden regenerar plantas de sandía, callos vegetales, brotes vegetales y células vegetales que están intactas en las plantas o partes de plantas tales como el polen, las flores, las semillas, hojas y tallos.

Como se utiliza en el presente documento tener un "fenotipo de carne ultra-firme" en una sandía significa que la carne comestible de una sandía tiene al menos aproximadamente 15,6 N (3,5 libras de fuerza (lb/F)) de presión según se evalúa con un penetrómetro mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

Un penetrómetro es un dispositivo utilizado para medir la fuerza, tal como el que se utiliza para medir la firmeza de la fruta. Se puede utilizar para medir la firmeza tanto de la carne como de la piel. Como se utiliza en el presente documento, para los datos del informe, se utilizó un penetrómetro de mano con tres o cinco lecturas en fruta madura,

utilizando el modelo de penetrómetro FT011 (QA Supplies, Norfolk, VA) con una sonda de 8 milímetros (aproximadamente 7,9 mm (5/16 de pulgada)). Las libras de fuerza o lbf son las unidades de lectura del penetrómetro modelo FT011 y se proporcionan para las lecturas hechas utilizando exclusivamente la sonda de 8 milímetros.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, el término "población" significa una colección heterogénea de plantas que comparten una derivación parental común.

Como se utilizan en el presente documento, los términos "variedad" y "cultivar" significan un grupo de plantas similares que por su ascendencia genética y actuación pueden identificarse entre otras variedades dentro de la misma especie.

- 10 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sólidos solubles" significa el porcentaje de material sólido que se encuentra en la porción comestible de la fruta. Como se utiliza en el presente documento, los sólidos solubles se miden cuantitativamente con un refractómetro como grados Brix. Brix se define formalmente como el porcentaje en peso de sacarosa: si el único sólido soluble presente en una solución acuosa es sacarosa, entonces se mide el porcentaje de sacarosa actual. Sin embargo, si están presentes otros sólidos solubles, como es el caso casi siempre, la lectura no es igual al porcentaje de sacarosa, pero se aproxima al porcentaje total de sólidos solubles en la muestra. Abreviando, aunque el Brix se define técnicamente como el porcentaje en peso de sacarosa, los expertos en la técnica reconocen que el porcentaje en peso de sólidos solubles, según se obtiene con un refractómetro, se aproxima al porcentaje en peso de sacarosa e indica con precisión el dulzor. Por lo tanto, a mayor porcentaje de sólidos soluble, como se indica por el grado Brix, mayor es el dulzor percibido de la fruta.

- 20 Como se utiliza en el presente documento, un "alelo" se refiere a una de dos o más formas alternativas de una secuencia genómica en un locus determinado de un cromosoma.

Un "Locus de Rasgo Cuantitativo (QTL) " es una localización cromosómica que codifica los alelos que afectan la expresividad de un fenotipo.

- 25 Como se utiliza en el presente documento, un "marcador" significa una característica detectable que se puede utilizar para discriminar entre organismos. Ejemplos de dichas características incluyen los marcadores genéticos, marcadores bioquímicos, metabolitos, características morfológicas, y características agronómicas.

Como se utiliza en el presente documento, el término "fenotipo" significa las características detectables de una célula u organismo que pueden estar influenciadas por la expresión genética.

- 30 Como se utiliza en el presente documento, el término "genotipo" significa la construcción alélica específica de una planta.

- 35 Como se utiliza en el presente documento, el término "introducido" cuando se utiliza en referencia a un locus genético, se refiere a un locus genético que se ha introducido en un nuevo escenario genético. La introducción de un locus genético puede conseguirse por lo tanto mediante procedimientos de cruzamiento de plantas y/o por procedimientos de genética molecular. Dichos procedimientos de genética molecular incluyen distintas técnicas de transformación de plantas y/o procedimientos que proporcionan recombinación homóloga, recombinación no homóloga, recombinación específica del sitio, y/o modificación genómica que proporciona la sustitución de un locus o la conversión de un locus.

- 40 Como se utiliza en el presente documento, el término "unido", Cuando se utiliza en el contexto de marcadores de ácido nucleico y/o regiones genómicas, Significa que los marcadores o regiones genómicas se localizan en el mismo grupo de unión o cromosoma.

Como se utiliza en el presente documento, el término "madurez" significa la madurez del desarrollo de la fruta. La madurez indica el momento en el que una sandía está lista para recolectarse. En la sandía, la madurez viene asociada con los cambios en el color de la carne y el contenido en azúcares.

- 45 Como se utiliza en el presente documento, el término "indicar" cuando se utiliza en referencia a un genotipo de una plantase refiere a cualquier procedimiento por el que se indica que una planta tiene un cierto genotipo. Esto incluye cualquier medio de identificación de que una planta tiene un cierto genotipo. La indicación de un cierto genotipo puede incluir cualquier entrada en cualquier tipo de medio escrito o electrónico o base de datos por la que se proporcione el genotipo de la planta. Las indicaciones de un cierto genotipo también pueden incluir cualquier procedimiento en el que la planta se marca o se etiqueta físicamente. Ejemplos ilustrativos de marcado o etiquetado útiles en la invención incluyen un código de barras, una identificación de radiofrecuencia (RFID) o una etiqueta.

II. Resumen

Se desvelan en el presente documento plantas de sandía que comprenden en su genoma un locus alélico introducido asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme en el que el locus alélico introducido no se ha introducido previamente en el escenario genómico de una variedad o cultivar específico. Ciertas realizaciones

proporcionan procedimientos de detección de un genotipo en una planta de sandía asociado con un fenotipo de carne ultra-firme en una planta de sandía. Ciertas realizaciones de estos procedimientos incluyen la identificación y selección de una planta de sandía que comprende en su genoma un genotipo asociado con un fenotipo de carne ultra-firme. Se desvela adicionalmente en el presente documento procedimientos de producción de una planta de sandía que comprende en su genoma al menos un locus introducido asociado con un fenotipo de carne ultra-firme y procedimientos para la introducción de dicho alelo en una planta de sandía. Las plantas de sandía y las partes de la mismas producidas por cualquier de dichos procedimientos también se desvelan en el presente documento, así como secuencias de ácido nucleico polimórfico.

El uso de marcadores para deducir el fenotipo de interés da como resultado un ahorro en el programa de cruzamientos sustituyendo los costosos ensayos de fenotipaje que consumen mucho tiempo con el genotipaje. Adicionalmente, los programas de cruzamiento pueden diseñarse para dirigir explícitamente la frecuencia de fenotipos favorables específicos direccionando genotipos particulares (patente de Estados Unidos 6.399.855). La fidelidad de estas asociaciones se puede monitorizar continuamente para asegurar la capacidad predictiva y, por tanto, las decisiones de cruzamiento informadas (Publicación de Patente de EE. UU. 2005/0015827).

La producción satisfactoria de sandías depende de distintas prácticas hortícolas. Estas incluyen el manejo del suelo con atención especial a la fertilización apropiada, el establecimiento del cultivo con un espaciado apropiado, el control de malas hierbas, la introducción de abejas para la polinización, el riego, el manejo de plagas, y si se producen frutos de plantas triploides, una fuente de polen adecuada para la producción de sandías sin semillas (triploides). El tamaño y forma de la sandía, el color de la piel, el grosor y dureza, el tamaño, color y número de las semillas, el color, textura, y contenido de azúcares de la carne, y la ausencia de defectos de la fruta son todas características importantes que considerar en la selección de variedades de sandía. Las compañías comerciales de semillas normalmente ofrecen al agricultor la oportunidad de observar estos criterios en gráficos de demostración de sus variedades, y algunas Universidades de Agricultura proporcionan datos de análisis de los cultivos a los agricultores locales (Roberts y col. (2004), Maynard y Sidoti (2003), Schultheis y Thompson (2004), y Leskovar y col. (2004)).

Los cultivos de sandía se pueden establecer a partir de semillas o de trasplantes. El trasplante se ha vuelto más común debido a que el trasplante puede dar como resultado un cultivo más temprano en comparación con un cultivo producido a partir de la siembra directa. Cuando un agricultor quiere cultivar un cultivo de frutos sin semillas, prefiere el trasplante. El trasplante ayuda a conseguir que la planta completa se erija rápidamente, especialmente cuando los costes de las semillas son más altos, como con las semillas triploides, lo que hace que la siembra directa tenga más riesgo.

La sandía es la única cucurbitácea económicamente importante con hojas pinnatífidas (lobuladas); todas las demás especies tienen hojas completas (no lobuladas). El hábito de crecimiento de la sandía es como una enredadera rastrera. Los tallos son finos, pilosos, angulares, agrupados y tienen zarcillos en cada nodo. Los tallos están altamente ramificados y de hasta 9,1 m (30 pies) de largo (Wehner y col. En: Watermelons: Characteristics, Production and Marketing. Maynard, editor. ASHS Press, Alexandria, VA (2001)).

Los cultivadores de sandías tienen el desafío de anticiparse a los cambios en las condiciones de cultivo, la presión de los nuevos patógenos, y los cambios en las preferencias de los consumidores. Con estas proyecciones, un botánico intentará crear nuevos cultivares que se ajusten a las necesidades en desarrollo de los cultivadores, transportadores, minoristas, y consumidores. Por lo tanto, el botánico tiene el desafío de combinar en el único genotipo tantos atributos favorables como sea posible para la mejor distribución del crecimiento y consumo.

Una característica importante para el botánico es el tamaño de la fruta. El tamaño de la fruta es una consideración importante debido a que existen diferentes requisitos en el mercado por grupos particulares de transportistas y consumidores. Las categorías generales son: icebox (<5,4 kg (12 lb)), pequeña (5,4 - 8,2 kg (12-18 lb)), mediana (8,2 -10,9 kg (18-24 lb)), grande (10,9-14,5 kg (24-32 lb)), y gigante (>14,5 kg (32 lb)). El tamaño de la fruta se hereda de manera poligénica, con una estimación de 25 genes implicados. La fruta se distribuye desde el cultivador al minorista mediante los transportistas, que se enfocan con las categorías de peso particulares, tales como 8,2-10,9 kg (18-24 lb) para las que tienen semillas y 6,4-8,2 kg (14-18 lb) para las que no tienen semillas. Aunque el consumo histórico ha sido para estos tamaños de fruta, existe una tendencia creciente en el mercado de una nueva clase de híbridos de sandía pequeños (con un peso de la fruta de entre 1,4-4,1 kg (3-9 lb)).

La firmeza de la carne de la fruta es otra característica importante. Los consumidores tienen preferencias de textura variables para la sandía, y la firmeza de la carne se correlaciona con la textura. Adicionalmente, la firmeza de la fruta es un parámetro crítico que determina cuando durará la fruta cortada en la vitrina del minorista. La investigación de la vida de almacenamiento de la fruta cortada habitualmente es cualitativa, con evaluaciones sobre cuándo la fruta se vuelve "babosa" (Perkins-Veazie y col. 1998 HortScience 33:605). Una evaluación más cuantitativa de la vida de almacenamiento de la fruta cortada es medir la firmeza de la carne utilizando directamente un penetrómetro y/o la exudación de líquido de la fruta cortada.

Otra característica interna importante es la calidad (véase Wehner y col. En: Watermelons: Characteristics, Production and Marketing. Maynard, editor. ASHS Press, Alexandria, VA (2001)). Entre las más importantes de estas

características está el dulzor, que se mide por el Brix, con sabor no amargo. El panel de datos de sabor demostraba una correlación directa de las puntuaciones de buen sabor con niveles de Brix más altos (Nip y col. (1968) Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 93:547). Los niveles de Brix aumentan según se desarrolla la fruta y madura en la trepadora. Por lo tanto, los frutos inmaduros tendrán un dulzor inaceptablemente bajo para el consumidor, si se recoge demasiado pronto, el tejido comestible tampoco tendrá un color comestible. Las recomendaciones cuantitativas para la sandía se han publicado. Mientras que Wehner y col. Sugieren niveles de Brix entre un 10 % y un 14 % de Brix, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) también ha establecido las referencias de calidad para la fruta para los niveles de Brix (Convención para los grados de la sandía, Departamento de Agricultura de EE. UU. (1978)). De acuerdo con estos niveles convencionales, las partes comestibles de la fruta que no tienen menos de 8 Brix se consideran que son "Buenas" mientras que las partes comestibles de la fruta que no tienen menos de 10 Brix se consideran que son "Muy Buenas".

III. Carne de sandía ultra-firme

La firmeza de la carne de sandía es un rasgo importante de calidad de la fruta con varios beneficios para los agricultores, procesadores, minoristas, y consumidores. Las sandías con la carne más firme pasan más tiempo en el campo, permitiendo que los agricultores recolecten menor frecuentemente y/o recolecten la fruta en un estadio más maduro (un 85-95 % de madurez frente a un 70 % de las referencias del mercado actual). Retienen agua, nutrientes, y sabor durante el procesamiento, teniendo de esta manera un rendimiento de corte fresco mayor para los procesadores, menor exudación, y una vida de almacenamiento más larga para los minoristas, y consumidores. Los productos de sandía comercializados actualmente tienen normalmente una firmeza de aproximadamente 8,9 N (2 lb/F), mientras que las sandías con un fenotipo de carne ultra-firme tiene una carne comestible que resiste una presión de al menos 15,6 N (3,5 lb/F). La Tabla 1 muestra los datos de firmeza de la carne de los híbridos comerciales y las líneas endogámicas.

Tabla 1. Revisión de la firmeza en cultivares típicos de sandía y líneas endogámicas. Las lecturas de firmeza media están en Newtons (libras de fuerza) como se describe en el presente documento.

Línea	Origen	Ploidía	Firmeza
Tri-X 313	Syngenta/Rogers	Triploide	6,2 (1,4)
Millionaire	Harris Moran	Triploide	8,0 (1,8)
Revolution	SunSeeds	Triploide	7,6 (1,7)
Majestic	Seminis	Triploide	7,6 (1,7)
Olympia	Seminis	Triploide	7,1 (1,6)
Omega	Seminis	Triploide	6,7 (1,5)
PS110-5288-9	Seminis	Triploide	10,2 (2,3)
4082	Seminis	Tetraploide	8,9 (2)
4084	Seminis	Tetraploide	6,7 (1,5)
4090	Seminis	Tetraploide	7,1 (1,6)
4133	Seminis	Tetraploide	9,8 (2,2)
4134	Seminis	Tetraploide	10,7 (2,4)
4135	Seminis	Tetraploide	9,8 (2,2)
4137	Seminis	Tetraploide	12,0 (2,7)
4138	Seminis	Tetraploide	9,8 (2,2)
47602A	Seminis	Diploide	6,7 (1,5)
4203	Seminis	Diploide	6,2 (1,4)
Cooperstown	Seminis	Triploide	Firme
Fenway	Seminis	Triploide	Firme
Royal Star	Seminis	Diploide	Firme
Sentinel	Seminis	Diploide	Firme
Tri-X Brand 626	Syngenta/Rogers	Diploide	Firme

(continuación)

Línea	Origen	Ploidía	Firmeza
W-1128	Seminis	Diploide	Firme
W-1119	Seminis	Diploide	Firme
BSI 2532	Seminis	Diploide	Firme
BSI 2527	Seminis	Diploide	Firme
W-2068	Seminis	Diploide	Firme
W-2741	Seminis	Diploide	Firme
W-1488	Seminis	Diploide	Firme
BSI2543	Seminis	Diploide	Firme
Extazy	Hazera	Triploide	Firme
Solitaire	Golden Valley	Triploide	Firme

Se expone en el presente documento que se ha identificado un locus de rasgo cuantitativo (QTL) con efectos principales para la firmeza y marcadores únicos del polimorfismo nucleotídico (SNP) en la proximidad de este locus que se pueden utilizar para la introducción de esta región genómica para un germoplasma deseado, tal como mediante selección asistida por marcador y/o retrocruzamiento asistido por marcador. Se obtuvo una población de plantas de un cruce entre las líneas de sandía 03LB3378-1 y WAS-35-2438. A partir de esta población, se construyó un mapa de unión de 19 grupos de unión utilizando 404 marcadores polimórficos. El análisis de mapeo de QTL revelaba un locus principal que controla la firmeza de la carne en el extremo proximal del grupo de unión 9. Este descubrimiento de un QTL de firmeza principal facilitará el desarrollo de productos de sandía con carne ultra-firme.

La Tabla 2 muestra la firmeza de la carne y el contenido en azúcares de la línea endogámica PI296341, y otras líneas endogámicas distintas creadas a partir de la PI296341 (véase la Publicación de Solicitud de patente de EE. UU. 2010/00306883). PI29634 es resistente al marchitamiento por *Fusarium*, patógeno tipo 2 (*Fusarium oxysporum*), y se caracteriza por tener frutos redondos muy pequeños de aproximadamente 10,2 cm (4 pulgadas) y aproximadamente 15,2 cm (6 pulgadas) de diámetro y que pesa entre aproximadamente 0,45 kg (1 libra) y aproximadamente 1,2 kg (2,6 libras). Su carne es blanca, muy firme, y es baja en azúcares. Las evaluaciones organolépticas de estos frutos varían de la no percepción del dulzor al amargor. Tabla 2. La firmeza y contenido en azúcares de las líneas endogámicas y su fuente PI296341. Las lecturas de firmeza media están en Newtons (libras de fuerza) y el contenido en azúcares se expone como un % de Brix como se describe en el presente documento.

Línea	Origen	Ploidía	Firmeza	Contenido en azúcares
PI296341	Colección de la USDA	Diploide	60,1 (13,5)	1,6
7132	Solicit. de EE. UU. N.º 12/856.286	Triploide	20,9 (4,7)	10,2
7133	Solicit. de EE. UU. N.º 12/856.286	Triploide	27,6 (6,2)	11,7
4201	Solicit. de EE. UU. N.º 12/856.286	Diploide	35,6 (8)	9,7
4203	Solicit. de EE. UU. N.º 12/856.286	Diploide	34,7 (7,8)	10,8
4204	Solicit. de EE. UU. N.º 12/856.286	Diploide	28,9 (6,5)	9,7
4207	Solicit. de EE. UU. N.º 12/856.286	Diploide	28,9 (6,5)	10

Para la mayoría de los objetivos de cruzamiento, los botánicos comerciales trabajan dentro de un germoplasma al que se hace referencia a menudo como el "tipo cultivado". Este germoplasma es fácil de cruzarse debido a que en general se lleva a cabo bien cuando se evalúa en cuanto a la actuación horticultural. La ventaja de actuación que proporciona el tipo cultivado a veces se anula por una falta de diversidad alélica. Esto es el sacrificio que acepta un botánico cuando trabaja con germoplasma cultivado de actuación total mejor, pero con una carencia de diversidad alélica. Los botánicos aceptan generalmente este sacrificio debido a que el progreso es más rápido cuando se trabaja con material cultivado que cuando se cruza con fuentes genéticamente diversas.

Por el contrario, cuando un botánico hace cruzamientos intraespecíficos, o cruzamientos interespecíficos, se produce una compensación inversa. En estos ejemplos, un botánico cruza normalmente germoplasmas cultivados con un tipo no cultivado. En dichos cruzamientos, el botánico puede tener acceso a nuevos alelos a partir del tipo no

cultivado, pero puede tener que superar la resistencia genética asociada con el parental donante. Debido a la dificultad con esta estrategia de cruzamiento, a menudo falla esta estrategia debido a problemas de fertilidad y fecundidad. La dificultad con esta estrategia de cruzamiento se extiende a muchos cultivos, y se ejemplifica con un importante fenotipo de resistencia a enfermedades que se describió por primera vez en el tomate en 1944 (Smith, Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 44:413-16). En este cruzamiento se transfería una resistencia a una enfermedad por nematodos del *L. peruvianum* (PI128657) en un tomate cultivado. A pesar del cruzamiento intensivo, no fue hasta mediados de los 70 que los botánicos pudieron superar la resistencia genética y lanzar líneas satisfactorias que albergaban este rasgo. Además, incluso hoy día, los botánicos de tomates suministran este gene de resistencia a la enfermedad a una variedad híbrida a partir solo de un parental. Esto permite que se enmascare la resistencia genética remanente. El éxito de la inventiva de esta estrategia de cruzamiento ha sido reconocido por la USPTO (Patentes de Estados Unidos 6.414.226, 6.096.944, 5.866.764 y 6.639.132). En la sandía, el acceso de la introducción en la planta normalmente da líneas que producen frutos con una producción y cualidades comestibles no deseables. Incluso aunque estas líneas tienen pocas calidades hortícolas, algunos botánicos de la sandía, al igual que algunos botánicos de cultivos, intentan el cruzamiento con estas líneas P1 debido a que contienen potencialmente nuevos alelos. Hasta la fecha, el objetivo de los botánicos que se ha intentado más comúnmente para el uso de las líneas P1 es introducir nuevos genes de resistencia a la enfermedad. El procedimiento de introducción de nuevos genes de resistencia de las líneas P1 en tipos comerciales aceptables es un procedimiento largo y a menudo arduo. Este procedimiento puede ser difícil debido a que el rasgo puede ser poligénico, o tener una baja heredabilidad, o tener una resistencia a la unión o alguna combinación de estos.

Algunos fenotipos se determinan por el genotipo en un locus. Estos rasgos simples, como los que estudió Gregor Mendel, fallan en las categorías intermitentes tales como las semillas verdes o amarillas. La mayor variación que se observa en la naturaleza, sin embargo, es continua, como en el rendimiento de campo de maíz, o la presión sanguínea humana. A diferencia de los rasgos heredados simplemente, la variación continua puede ser el resultado de una herencia poligénica. Se hace referencia a los loci que afectan a la variación continua como loci de rasgos cuantitativos (QTL). La variación en el fenotipo de un rasgo cuantitativo es el resultado de la composición alélica en los QTL y el efecto del entorno. La heredabilidad de un rasgo es la proporción de la variación fenotípica atribuida a la varianza genética. Esta relación varía entre 0 y 1,0. Por lo tanto, un rasgo con heredabilidad cerca de 1,0 no está muy afectada por el entorno. Los expertos en la técnica reconocen la importancia de la creación de líneas comerciales con rasgos hortícolas de alta heredabilidad debido a que estos cultivares permitirán a los agricultores la producción de un cultivo uniforme con las especificaciones del mercado.

La sandía procesada mínimamente tiene una vida de almacenamiento corta de 2 a 3 días (Perkins-Veazie y col. (1998) Hortscience 33:605; Wehner y col. en: Watermelons: Characteristics, Production and Marketing. Maynard, editor. ASHA Press, Alexandria, VA (2001)). Aunque la vida de almacenamiento máxima de la sandía cortada es solo de pocos días, la calidad del producto comienza a deteriorarse rápidamente después de procesarse. En los productos cortados presentados en envases alimentarios de plástico, el consumidor puede ver este rápido deterioro debido al líquido que pierden los productos cortados y que se acumula en el fondo del envase.

La pérdida de agua (a la que se hace referencia también como exudación) se puede evaluar utilizando el siguiente ensayo de retención de agua. El ensayo se lleva a cabo a 4 °C. Para medir la pérdida de líquidos, la parte comestible de la fruta se cortó en cubos de aproximadamente 25 cm (1") y se pesó. El tamaño del cubo se escogió así debido a que se aproximaba mejor al tamaño del producto procesado que se encuentra en los minoristas. Durante un periodo de 16 días las muestras sólidas se volvieron a pesar, y la pérdida de líquido se estimó calculando el porcentaje de pérdida de peso.

Los experimentos previos han demostrado que, aunque los productos cortados de los cultivares convencionales pueden tener una vida de almacenamiento de hasta 2 a 3 días, el deterioro según se medía por la exudación de agua comienza casi inmediatamente después del corte. En cambio, las líneas de carne firme resistían la exudación rápida de líquido de las sandías convencionales. La carne cortada de la fruta de una sandía desvelada en el presente documento con un genotipo asociado con un fenotipo de carne ultra-firme puede perder menos de aproximadamente un cuatro por ciento de agua después de un almacenamiento de tres días a 4 ° centígrados. La carne de fruta cortada de una sandía desvelada en el presente documento con un genotipo asociado con un fenotipo de carne ultra-firme pierde menos de aproximadamente un tres por ciento o menos de aproximadamente un dos por ciento de agua después de tres días de almacenamiento a 4 °C. La sandía que retiene líquido cuando se corta alcanza un periodo más largo de aceptabilidad por el consumidor después del procesamiento en el mercado de sandía procesada mínimamente.

IV. Región genómica, QTL, ácidos nucleicos polimórficos, y alelos asociados con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme

Los solicitantes han descubierto una región genómica, QTL, alelos, ácidos nucleicos polimórficos y marcadores unidos que cuando se presentan en ciertas formas alélicas se asocian con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme. La región genómica se localiza en el extremo proximal del grupo de unión 9 de la sandía (del mapa genético de la población de 03LB3378-1 x WAS-35-2438) y está flanqueada por los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18). Se descubrió que un QTL principal de firmeza de la carne de sandía estaba localizado dentro de esta región. Ciertas de las distintas realizaciones de la invención utilizan un QTL o marcador de

ácido nucleico polimórfico y un marcador o alelo localizado en esta región genómica. Las subregiones de esta región genómica asociada con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme se pueden describir como que están flanqueadas por:

- 5 a) los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0251011 (SEQ ID NO: 12);
- b) los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0252274 (SEQ ID NO: 10);
- c) los loci NW0248953 NW0251464 (SEQ ID NO: 2) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18);
- d) los loci NW0248953 (SEQ ID NO: 2) y NW0251011 (SEQ ID NO: 12);
- e) los loci NW0248953 (SEQ ID NO: 2) y NW0252274 (SEQ ID NO: 10);
- 10 f) los loci NW0250301 (SEQ ID NO: 3) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18);
- g) los loci NW0250301 (SEQ ID NO: 3) y NW0251011 (SEQ ID NO: 12); o
- h) los loci NW0250301 (SEQ ID NO: 3) y NW0252274 (SEQ ID NO: 10).

Ciertas de las distintas realizaciones de la invención utilizan un QTL o marcador de ácido nucleico polimórfico o un alelo localizado en una o más de estas subregiones.

15 Los marcadores del ácido nucleico polimórfico localizados dentro de la región flanqueada por los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18) incluyen: NW0248953 (SEQ ID NO: 2), NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248949 (SEQ ID NO: 4), NW0248646 (SEQ ID NO: 5), NW0249077 (SEQ ID NO: 6), NW0249132 (SEQ ID NO: 7), NW0252494 (SEQ ID NO: 8), NW0248163 (SEQ ID NO: 9), NW0252274 (SEQ ID NO: 10), NW0248905 (SEQ ID NO: 11), NW0251011 (SEQ ID NO: 12), NW0248869 (SEQ ID NO: 13), NW0251470 (SEQ ID NO: 14), NW0251308 (SEQ ID NO: 15), NW0250718 (SEQ ID NO: 16) y NW0248059 (SEQ ID NO: 17). Se cree que dichos

20 marcadores se asocian con el fenotipo de carne de sandía ultra-firme debido a su localización y proximidad con el QTL de firmeza principal. Ciertas de las distintas realizaciones de la invención utilizan uno o más ácidos nucleicos polimórficos seleccionados de entre este grupo. En determinadas realizaciones, se utilizan al menos dos de dichos marcadores.

Se descubrió que el pico del QTL estaba en estrecha proximidad a al menos NW0249132 (SEQ ID NO: 7),

25 NW0248163 (SEQ ID NO: 9), NW0251011 (SEQ ID NO: 12) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18). Hasta la fecha, NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248646 (SEQ ID NO: 5), y NW0252274 (SEQ ID NO: 10) se han validado como predictivos del fenotipo de carne ultra-firme en diversos germoplasmas de sandía. En ciertas de las distintas realizaciones de la invención, se utiliza al menos un ácido nucleico polimórfico seleccionado de entre el grupo que consiste en NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248646 (SEQ ID NO: 5) y NW0252274 (SEQ ID NO: 10). En ciertas

30 realizaciones, se utilizan al menos dos ácidos nucleicos polimórficos seleccionados de entre este grupo. En determinadas realizaciones, se utilizan al menos los tres de NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248646 (SEQ ID NO: 5) y NW0252274 (SEQ ID NO: 10).

En determinadas realizaciones de la invención, es útil detectar en, o determinar si, una planta de sandía tiene un estado alélico que se asocie con un fenotipo de carne ultra-firme (Tabla 3). En algunas otras realizaciones, es útil

35 detectar en, o determinar si, una planta de sandía tiene un estado alélico que no se asocia con un fenotipo de carne ultra-firme (Tabla 3) (La posición del sitio polimórfico identificado en la Tabla 3 para cada una de estas secuencias marcadoras está contenida en la Tabla 6 y el Listado de Secuencias adjunto).

En determinadas realizaciones, se identifica una planta en la que se detecta al menos un alelo del locus polimórfico asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme. Por ejemplo, una planta diploide en la que el estado alélico de un locus polimórfico comprende un alelo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme y un alelo que no se asocia con un fenotipo de carne ultra-firme (es decir, heterocigota en ese locus). Puede ser útil cruzar una

40 planta que sea heterocigota en un locus asociado con un fenotipo de carne ultra-firme con una planta que sea heterocigota de manera similar o que no contenga ningún alelo asociado con un fenotipo de carne ultra-firme en el locus, para producir una progenie con un cierto porcentaje de plantas que sean heterocigotas en ese locus. Las plantas homocigotas en el locus se pueden producir entonces mediante distintos procedimientos de cruzamiento, tales como por autocruzamiento o dihaploidización. En otro ejemplo, se identifica una planta de sandía triploide o tetraploide en la que el estado alélico en un locus comprende al menos un alelo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme en el que los otros alelos del locus pueden tener también o no un alelo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme. Los ejemplos incluyen la identificación de una planta que tenga al menos un

45 alelo en el estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0252274 (SEQ ID NO: 10); que tenga al menos un alelo en el estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0248646 (SEQ ID NO: 5); o que tenga al menos un alelo en el estado alélico G del ácido nucleico polimórfico de NW0250301 (SEQ ID NO: 3); cualquier combinación de dos de estos estados alélicos, o que comprenda los tres. Ciertas realizaciones incluyen una planta de sandía que sea una planta diploide que tenga un alelo en el estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0252274 (SEQ ID NO: 10) y un alelo en el estado alélico T del ácido nucleico polimórfico de NW0252274 (SEQ ID NO: 10); sea una

50 planta diploide que tenga un alelo en el estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0248646 (SEQ ID NO: 5) y un alelo en el estado alélico A del ácido nucleico polimórfico de NW0248646 (SEQ ID NO: 5); o sea una planta diploide que tenga un alelo en el estado alélico G del ácido nucleico polimórfico de NW0250301 (SEQ ID NO: 3) y un alelo en el estado alélico A del ácido nucleico polimórfico de NW0250301 (SEQ ID NO: 3); cualquier combinación de

55 dos de estos estados alélicos, o que comprenda los tres. Un experto en la técnica reconocerá que puede ser útil identificar un marcador de ácido nucleico polimórfico en un locus genético que no esté asociado con un fenotipo de

60

carne de sandía ultra-firme en una planta, tal como cuando se introduce un QTL asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme en un entorno genético no asociado con dicho fenotipo.

En determinadas realizaciones, se identifica una planta en la que se detectan al menos dos alelos asociados con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme en un locus. Por ejemplo, una planta diploide con ambos estados alélicos en un locus polimórfico se asocia con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme (es decir, homocigota en ese locus). Por ejemplo, se identifica una planta de sandía triploide o tetraploide en la que el estado alélico en un locus comprende al menos dos alelos asociados con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme en el que los otros alelos del locus pueden tener también o no un alelo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme. Ciertos ejemplos incluyen la identificación de: una planta de sandía diploide que tenga el estado alélico CC del ácido nucleico polimórfico de NW0248646 (SEQ ID NO: 5); una planta de sandía diploide que tenga el estado alélico CC del ácido nucleico polimórfico de NW0248646 (SEQ ID NO: 5); O una planta de sandía diploide que tenga el estado alélico GG del ácido nucleico polimórfico de NW0250301 (SEQ ID NO: 3); cualquier combinación de dos de estos estados alélicos, o la planta que comprenda los tres.

Tabla 3. Posiciones genéticas * y estados alélicos alternativos de los marcadores de ácido nucleico polimórfico de la invención que indican el estado alélico asociado con el QTL de carne de sandía ultra-firme.

Nombre del marcador	SEQ ID NO:	de unión Grupo	Posición en el mapa genético (cM)	Alelo 1 (Carne no firme)	Alelo 2 (asociado con un QTL de fenotipo de carne ultra-firme)
NW0251464	1	2	122,4666304	A o G	eliminación, ausencia de alelo
NW0248953	2	2	131,6920961	A	T
NW0250301	3	2	134,2525663	A	G
NW0248949	4	2	136,2284633	G	A
NW0248646	5	2	136,9855946	A	C
NW0249077	6	2	136,9855946	A o C	eliminación, ausencia de alelo
NW0249132	7	2	136,9920737	T o C	eliminación, ausencia de alelo
NW0252494	8	2	137,6844216	T o C	eliminación, ausencia de alelo
NW0248163	9	2	138,2842599	A o C	eliminación, ausencia de alelo
NW0252274	10	2	138,5377262	T	C
NW0248905	11	2	138,7747985	A	G
NW0251011	12	2	138,7747985	C	T
NW0248869	13	2	139,8297546	T	G
NW0251470	14	2	139,8297546	A	T
NW0251308	15	2	144,5711848	C	T
NW0250718	16	2	145,8088579	C	T
NW0250266	18	2	157,6817827	T	C

* Grupo de unión 9 del mapa genético de la población derivada de 03LB3378-1 x WAS-35-2438 que se alineó con el grupo de unión 2 de un mapa SNP de consenso de sandía construido con tres poblaciones de segregación adicionales. En la tabla 3, las posiciones del mapa genético representan las posiciones en el grupo de unión 2 del mapa SNP de consenso de la sandía.

Al igual que en los seres humanos, las sandías son naturalmente diploides, que tiene sus cromosomas dispuestos por parejas. Las plantas de sandía, sin embargo, pueden someterse a duplicación de su conjunto completo de cromosomas y existir como tetraploides. Aunque es poco común en las sandías que produzcan tetraploides espontáneas, este procedimiento se puede producir de manera rutinaria en el laboratorio utilizando técnicas de biología celular. Se pueden producir semillas tetraploides cruzando un parental tetraploide y un parental diploide. Cuando se cultivan plantas triploides, se aborta la formación de semillas en la fruta debido a las diferencias en el nivel de ploidía, dando como resultado frutas sin semillas.

Un parental masculino de una planta diploide puede ser homocigota para el QTL o un marcador de ácido nucleico polimórfico asociado con el fenotipo de carne de sandía firme. El parental masculino diploide se puede cruzar con una hembra tetraploide que carece del QTL o un marcador de ácido nucleico polimórfico asociado con el fenotipo de carne de sandía firme, para producir una progenie híbrida triploide. Esto da como resultado una copia del QTL o el alelo marcador polimórfico asociado con el fenotipo de carne de sandía firme (del parental diploide) y dos alelos no marcadores/QTL (del parental tetraploide) en el híbrido triploide.

Se contempla en el presente documento el uso de la dihaploidización para producir una línea endogámica. Una planta haploide tiene solo una copia de cada cromosoma en vez del par de cromosomas normal de una planta diploide. Las plantas haploides se pueden producir, por ejemplo, mediante el tratamiento con un inductor haploide. Las plantas haploides se pueden someter a un tratamiento que produzca que la única copia de cromosomas se convierta en doble, produciendo una copia duplicada del conjunto original. La planta resultante se denomina "doble-haploide" y contiene pares de cromosomas que están en un estado alélico homocigoto en cualquier locus determinado. La dihaploidización puede reducir el tiempo necesario para desarrollar nuevas líneas endogámicas en comparación con el desarrollo de líneas a través de sucesivas rondas de retrocruzamientos.

Como se utiliza en el presente documento, en una planta diploide, el estado alélico homocigoto se representa como AA, CC, GG, o TT, donde la posición polimórfica del alelo designada comprende bases nucleotídicas alternativas. Como se utiliza en el presente documento, en una planta diploide, el estado alélico homocigoto se representa como DD, donde la posición polimórfica designada comprende una eliminación de una o más bases en comparación con el alelo alternativo.

La región genómica, QTL y los marcadores polimórficos identificados en el presente documento también pueden mapearse con respecto a cualquier mapa genético o físico disponible públicamente para colocar la región descrita en el presente documento sobre dicho mapa. Un experto en la técnica también entenderá que también se pueden utilizar ácidos nucleicos polimórficos adicionales que se unen genéticamente al QTL asociado con un fenotipo de carne de sandía firme y que se mapean dentro de 5 cM o 1 cM del QTL asociado con un fenotipo de carne de sandía firme.

IV. Introducción de locus genómico asociado con un fenotipo de carne firme

Se desvelan en el presente documento germoplasmas de sandía o plantas de sandía que comprenden una región genómica introducida que se asocia con un fenotipo de carne de sandía firme y un procedimiento para la obtención de los mismos. La introducción asistida por marcador implica la transferencia de una región cromosómica, definida por uno o más marcadores, desde un germoplasma a un segundo germoplasma. La descendencia de un cruce que contenga una región genómica introducida puede identificarse por la combinación de marcadores característicos de la región genómica introducida a partir de un primer germoplasma (por ejemplo, un germoplasma de fenotipo de carne de sandía firme) y las características de los marcadores unidas y no unidas del entorno genético deseado de un segundo germoplasma. Los marcadores de los flancos que identifican una región genómica asociada con un fenotipo de carne de sandía firme son los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18), y los que identifican subregiones de los mismos incluyen:

- a) los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0251011 (SEQ ID NO: 12);
- b) los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0252274 (SEQ ID NO: 10);
- c) los loci NW0248953 (SEQ ID NO: 2) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18);
- d) los loci NW0248953 (SEQ ID NO: 2) y NW0251011 (SEQ ID NO: 12);
- e) los loci NW0248953 (SEQ ID NO: 2) y NW0252274 (SEQ ID NO: 10);
- f) los loci NW0250301 (SEQ ID NO: 3) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18);
- g) los loci NW0250301 (SEQ ID NO: 3) y NW0251011 (SEQ ID NO: 12); y
- h) los loci NW0250301 (SEQ ID NO: 3) y NW0252274 (SEQ ID NO: 10).

Los marcadores de los flancos que se encuentran tanto en el extremo del telómero proximal como en el extremo del centrómero proximal (tal como los que se proporcionan en el presente documento) de cualquiera de estos intervalos genómicos, pueden ser útiles en una variedad de esfuerzos de cruzamiento que incluyen la introducción de regiones genómicas asociadas con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme en un escenario genético que comprende marcadores asociados con un germoplasma que habitualmente contiene un genotipo asociado con un fenotipo de carne no firme. Se contemplan en el presente documento los marcadores que están unidos sea inmediatamente adyacentes o adyacentes al QTL del fenotipo de carne de sandía ultra-firme que permite la introducción del QTL en ausencia de un ADN ajeno unido a partir del germoplasma que contiene el QTL. Los expertos en la técnica apreciarán que cuando se busca la introducción de una región genómica más pequeña que comprende un QTL asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme descrito en el presente documento, se puede utilizar cualquiera de los marcadores del telómero proximal o el centrómero proximal que estén inmediatamente adyacentes a una región genómica más grande que comprenda el QTL para introducir esa región genómica más pequeña.

Se contemplan por lo tanto las plantas de sandía o germoplasmas que comprenden una región introducida que se asocia con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme en los que al menos un 10 %, un 25 %, un 50 %, un 75 %, un 90 % o un 99 % de las secuencias genómicas restantes albergan marcadores característicos de una planta o germoplasma que de otra manera o habitualmente comprende una región genómica asociada con un fenotipo de carne no ultra-firme. Además, también se contemplan plantas de sandía que comprenden una región introducida en la que las regiones unidas estrechamente adyacentes y/o inmediatamente adyacentes, QTL y marcadores proporcionados con esta que comprenden secuencias genómicas que albergan marcadores característicos de las plantas de sandía o germoplasma que de otra manera o habitualmente comprende una región genómica asociada con el fenotipo.

V. Técnicas de cruzamiento asistidas molecularmente

Los marcadores genéticos que se pueden utilizar en la práctica del procedimiento desvelado en el presente documento incluyen la Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), Repeticiones de secuencia simple (SSR), Polimorfismos de nucleótido único (SNP), Polimorfismos de inserción/eliminación (Indels), Repeticiones en tándem de número variable (VNTR) y ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD). El descubrimiento y desarrollo de marcadores en los cultivos proporciona el marco inicial para aplicaciones de actividades de cruzamiento asistido por marcador (Publicaciones de patente de EE. UU. 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 los que se pueden identificar los alelos) entre ellos.

Como se establece, 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 6.207.367). Estos marcadores forman la base para la determinación de asociaciones con fenotipos y se puede utilizar para dirigir la ganancia genética. En ciertas realizaciones de los procedimientos de la invención, los ácidos nucleicos polimórficos se pueden utilizar para detectar en una planta de sandía un genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía firme, identificar una planta de sandía un genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía firme, para seleccionar una planta de sandía un genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía firme. En ciertos procedimientos desvelados en el presente documento, los ácidos nucleicos polimórficos se pueden utilizar para producir una planta de sandía que comprenda en su genoma un locus introducido asociado con un fenotipo de carne de sandía firme. Los ácidos nucleicos polimórficos se pueden utilizar para cruzar la progenie de plantas de sandía que comprendan un locus asociado con un fenotipo de carne de sandía firme.

Ciertos marcadores genéticos útiles incluyen marcadores "dominantes" y "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. La presencia del fenotipo de marcador dominante (por ejemplo, una banda de ADN) es una indicación de que un alelo está presente en condiciones de homocigosis o heterocigosis. La ausencia del fenotipo de marcador dominante (por ejemplo, la ausencia de una banda de ADN) es simplemente la evidencia de que está presente "algún otro" alelo no definido. En el caso de las poblaciones en las que los individuos son predominantemente homocigotos y los loci son predominantemente dimórficos, los marcadores dominantes y codominantes pueden ser valiosos de manera igual. Según las poblaciones se vuelven más heterocigotas y multialélicas, los marcadores codominantes a menudo se convierten en más informativos del genotipo que los marcadores dominantes.

Los análisis basados en ácido nucleico para la determinación de la presencia o ausencia del polimorfismo genético (es decir, por genotipaje) se pueden utilizar en los programas de cruzamiento para la identificación, selección e introducción. Está disponible una amplia variedad de marcadores genéticos para los análisis de polimorfismos genéticos y es conocida por los expertos en la técnica. El análisis se puede utilizar para seleccionar genes, partes de genes, QTL, alelos, o regiones genómicas que comprenden o están unidos a un marcador genético que está unido o asociado con un fenotipo de carne de sandía firme.

Como se utiliza en el presente documento, el análisis de ácido nucleico incluye procedimientos de detección basados en la PCR (por ejemplo, ensayos TaqMan), procedimientos de micromatrices, procedimientos basados en espectrometría de masas y/o procedimientos de secuenciación de ácidos nucleicos, incluyendo la secuenciación del genoma completo. La detección de sitios polimórficos en una muestra de ADN, ARN o ADNc se puede facilitar mediante el uso de procedimientos de amplificación de ácido nucleico. Dichos procedimientos aumentan específicamente la concentración de polinucleótidos que abarcan el sitio polimórfico, o incluyen ese sitio y las secuencias localizadas distal o proximalmente a este. Dichas moléculas amplificadas pueden detectarse fácilmente mediante procedimientos de detección por electroforesis o fluorescencia.

Un procedimiento para conseguir dicha 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, utilizando pares de cebadores que sean capaces de hibridarse con las secuencias proximales que definen un polimorfismo en su forma de doble cadena. También se pueden utilizar procedimientos para el tipaje de ADN basándose en la espectrometría de masas. Dichos procedimientos se desvelan en las Patentes de EE. UU. 6.613.509 y 6.503.710 y las referencias que se encuentran en estas.

Los polimorfismos en las secuencias de ADN se pueden detectar o tipar mediante una variedad de procedimientos eficaces bien conocidos en la técnica incluyendo los que se desvelan en las Patentes de EE. UU. 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 utilizar en conjunción con cualquier procedimiento de tipaje de polimorfismo para tipar los polimorfismos en muestras de ADN genómico. Estas muestras de ADN genómico que se utilizan incluyen el ADN genómico aislado directamente de una planta, el ADN genómico clonado, o el ADN genómico amplificado.

Por ejemplo, los polimorfismos en las secuencias de ADN se pueden detectar mediante hibridación de sondas de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) como se desvela en las Patentes de Estados Unidos 5.468.613 y 5.217.863. La patente de Estados Unidos 5.468.613 desvela las hibridaciones con oligonucleótidos específicos de alelo en las que se pueden detectar variaciones de nucleótidos únicas o múltiples en la secuencia de ácido nucleico mediante un procedimiento en el cual la secuencia que contiene la variación de nucleótido se amplifica, transferida en una membrana y tratada con una sonda de oligonucleótido específico de alelo.

La secuencia de ácido nucleico diana también se puede detectar por procedimientos de ligadura a la sonda como se desvela en la Patente de EE. UU. 5.800.944 en la que la secuencia de interés se amplifica y se hibrida con sondas después de la ligadura para detectar una parte marcada de la sonda.

Las micromatrices también se pueden utilizar para la detección de polimorfismos, en la que los conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ensamblan de una manera solapada para representar una secuencia única de manera que una diferencia en la secuencia diana en un punto daría como resultado una hibridación parcial con la sonda (Borevitz y col., *Genome Res.* 13: 513-523 (2003); Cui y col., *Bioinformatics* 21:3852-3858 (2005). En una micromatriz cualquiera, se espera que habrá una pluralidad de secuencias diana, que pueden representar genes y/o regiones no codificantes, en la que cada secuencia diana se representa por una serie de oligonucleótidos solapados, más que por una única sonda. Esta plataforma proporciona una exploración de alto rendimiento de una pluralidad de polimorfismos. El tipaje de secuencias diana por 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 unión a sondas como se desvela en la patente de Estados Unidos n.º 5.616.464 que emplea al menos un par de sondas que tengan secuencias homólogas con las partes adyacentes de la secuencia de ácido nucleico diana y que tengan cadenas laterales que se unan no covalentemente para formar un tallo al emparejarse las 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 entrecruzamiento covalente con el otro miembro de la cadena lateral del tallo.

Otros procedimientos para la detección de los SNP e Indels incluyen los procedimientos de extensión de base única (SBE). Ejemplos de SBE incluyen los que se desvelan en las patentes de Estados Unidos 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 nucleotídico que está adyacente a un polimorfismo para incorporar un resto de nucleótido detectable al extenderse el cebador. El procedimiento SBE puede utilizar tres oligonucleótidos sintéticos. Dos de los oligonucleótidos sirven como cebadores de la PCR y son complementarios a la secuencia del locus del ADN genómico que flanquea una región que contiene el polimorfismo que se va a ensayar. A continuación de la amplificación de la región que contiene el polimorfismo, el producto de la PCR se mezcla con el tercer oligonucleótido (llamado cebador de extensión) que se diseña para hibridarse con el ADN amplificado adyacente al polimorfismo en presencia de una ADN polimerasa y dos didesoxinucleósido trifosfatos marcados de manera diferencial. Si está presente el polimorfismo en la matriz, uno de los didesoxinucleósido trifosfatos se puede añadir al cebador en una extensión de cadena de base única. El alelo presente se deduce entonces determinando cuál de los dos marcadores diferenciales se añadió al cebador de extensión. Las muestras homocigotas darán como resultado la incorporación de solo una de las dos bases marcadas y por lo tanto se detectará solo uno de los dos marcadores. Las muestras heterocigotas tienen ambos alelos presentes, y por lo tanto se incorporarán directamente ambos marcadores (en moléculas diferentes del cebador de extensión) y por lo tanto se detectarán ambos marcadores.

En otro procedimiento para la detección de polimorfismos, los SNP e Indels se pueden detectar por los procedimientos desvelados en las patentes de Estados Unidos 5.210.015; 5.876.930 y 6.030.787 en los que un oligonucleótido sonda que tiene un colorante indicador fluorescente en 5' un colorante interruptor en 3' se une covalentemente a los extremos 5' y 3' de la sonda. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del colorante indicador al colorante interruptor da como resultado la supresión de la fluorescencia del colorante indicador, por ejemplo, mediante transferencia de energía tipo Forster. Durante la PCR los cebadores directo e inverso se hibridan a una secuencia específica del ADN diana que flanquean un polimorfismo, mientras que la sonda de hibridación se hibrida a la secuencia que contiene el polimorfismo dentro del producto de PCR amplificado. En el siguiente ciclo de PCR la ADN polimerasa con actividad exonucleasa 5'→3' escinde la sonda y separa el colorante indicador del colorante interruptor dando como resultado el aumento de la fluorescencia del indicador.

El locus o loci de interés se pueden secuenciar directamente utilizando tecnologías de secuenciación de ácido nucleico. Los procedimientos de secuenciación de ácido nucleico que se conocen en la técnica incluyen las tecnologías proporcionadas por 454, Life Sciences (Branford, CT), Agencourt Bioscience (Beverly, MA), Applied Biosystems (Foster City, CA), LI-COR Biosciences (Lincoln, NE), Nimble-Gen Systems (Madison, WI), Illumina (San Diego, CA), y VisiGen Biotechnologies (Houston, TX). Dichas tecnologías de secuenciación de ácido nucleico comprenden formatos tales como matrices de lecho paralelo, secuenciación por ligadura, electroforesis capilar, microchips electrónicos, "biochips", micromatrices, microchips paralelos y matrices de molécula única, como ha revisado R. F. Service Science 2006 311:1544-1546.

Los marcadores que se van a utilizar en los procedimientos desvelados en el presente documento deberían ser preferentemente diagnósticos del origen con el fin de que se hagan deducciones sobre las poblaciones posteriores.

La experiencia hasta la fecha sugiere que los marcadores de SNP pueden ser ideales para el mapeo debido a que la probabilidad de que un alelo de SNP en particular se derive de orígenes independientes de la población existente de una especie en particular es muy baja. Por tanto, parece que los marcadores SNP son útiles para seguir y asistir la introducción de QTL.

5 Ejemplos

Las partes del siguiente ejemplo no cubiertas por el ámbito de las reivindicaciones son con fines ilustrativos.

Ejemplo 1: Carne de sandía firme

Los registros de carne de sandía firme se han identificado en diferentes especies y variedades del género *Citrullus* incluyendo la *C. colocynthis*, *C. lanatus* var. *citroides*, y *C. lanatus* var. *lanatus*. PI296341 es un registro de *C. lanatus* var. *citroides* que se originó en África disponible en Germplasm Resources Information Network. PI296341 se retrocruzó durante varias generaciones con líneas endogámicas de la élite más dulces (*C. lanatus* var. *lanatus*) para derivar la línea 3LB3387-1 de carne de sandía ultra-firme.

Se desarrolló una población segregada a partir del cruce de 03LB3387-1 y WAS-35-2438 mediante descendencia de semilla única para el mapeo del rasgo de carne ultra-firme. La población 03LB3387-1 x WAS-35-2438 consistía en 186 líneas F4:5 y se plantó en tres entornos: Woodland, CA y Tifton, GA Ensayo de Año 1, y Woodland, CA en el Ensayo de Año 3. Los dos experimentos de Woodland, CA se plantaron en diseños de bloques completamente aleatorios, mientras que en el experimento del Ensayo del Año 1 en Tifton era un diseño completamente aleatorio. Las líneas parentales 03LB3387-1 y WAS-35-2438 y su F1 híbrida se utilizaron como controles en cada uno de los tres experimentos. Los datos de firmeza, sólidos solubles totales (Brix), y de licopeno se recopilaron en los experimentos del Ensayo de Año 1 en Woodland y Tifton. Se recopilaron los datos de Firmeza y Brix del Ensayo de Año 3 en Woodland. Se recopilaron los datos de firmeza como tres lecturas del penetrómetro por fruto. El objetivo era posicionar las lecturas longitudinalmente en los tercios proximal, medio y distal, de cada fruto, y transversalmente a medio camino entre la piel y el centro. Los valores de Brix se midieron con un refractómetro de mano (Atago, modelo PAL-1) utilizando el jugo extraído con un exprimidor de las muestras de fruta ((~ 11,5 cm³) con color rojo maduro. El contenido en licopeno se cuantificó mediante HPLC utilizando un volumen de 4 a 5 muestras del centro (de ~ 21 cm³ cada una) tomadas de múltiples posiciones de carne de la fruta con color rojo maduro. Los datos se obtuvieron en el Ensayo del Año 1 utilizando un penetrómetro con una lectura máxima de 53,4 N (12 lb/F); por lo tanto, es posible que para los experimentos del Ensayo del Año 1, un valor expuesto de 12 puede representar actualmente un valor mayor de 53 N (12 lb/F). Durante el experimento del Ensayo del Año 3, se obtuvieron los datos con un instrumento que tenía un intervalo de lectura desde 4,4 a 133,4 N (1 a 30 lb/F). Por lo tanto, los datos de cada uno de los tres ensayos se analizaron por separado en vez de derivar las medias fenotípicas y llevar a cabo el análisis del mapeo del QTL a través de los tres entornos.

Se generaron las medias de mínimos cuadrados para la firmeza, Brix, y contenido en licopeno para cada familia en cada uno de los tres entornos. Los fenotipos de firmeza demostraban una distribución bimodal, que implicaba que se segregaba un único QTL principal para la firmeza en la población mapeada (FIGURA 1). Las líneas parentales 03LB3387-1 y WAS-35-2438 y su F1 híbrida demostraban fenotipos consistentes a lo largo de las localizaciones y los años (Tabla 4).

Tabla 4. Medias fenotípicas para la firmeza, Brix, y contenido en licopeno de las líneas parentales (03LB3387-1 y WAS-35-2438) y su F1 híbrida para cada uno de los tres experimentos.

	Woodland Ensayo de Año 1			Tifton Ensayo de Año 1			Woodland Ensayo de Año 3	
	Firmeza	Brix	Licopeno	Firmeza	Brix	Licopeno	Firmeza	Brix
03LB3387	48,8 (10,98)	9,00	49,68	47,1 (10,59)	8,85	44,70	51,9 (11,67)	9,04
WAS-35-2438	9,4 (2,11)	10,18	61,33	10,8 (2,43)	11,68	67,00	9,6 (2,15)	10,64
F1	33,8 (7,59)	9,87	62,26	35,9 (8,08)	10,88	79,24	27,1 (6,10)	10,29

Se genotiparon ciento ochenta y seis líneas 03LB3387-1 x WAS-35-2438 en la generación F4 utilizando 1.536 marcadores SNP. Se construyó un mapa de unión de la población de segregación utilizando 404 marcadores polimórficos con el software JoinMap. El mapa genético consistía en 19 grupos de unión que variaban en longitud desde 4,5 a 142,1 cM, y tenían una longitud media de 64,1 cM.

El análisis del mapeo de QTL que utilizaba el mapeo de intervalo compuesto en el Cartografiador de QTL identificaba un locus principal que controlaba la firmeza en el extremo proximal del grupo de unión 9 (FIGURA 2).

También se mapeó el QTL para el Brix y el contenido en Licopeno en el mismo intervalo genómico y tenían efectos QTL moderados o bajos (Tabla 5).

Tabla 5. Identificadores QTL de la firmeza, Brix, y contenido en licopeno en el grupo de unión 9 del mapa genético de la población derivada de 03LB3378-1 x WAS-35-2438. Se exponen la posición del QTL en el grupo de unión (cM), los efectos aditivos y de dominancia del QTL y los intervalos de confianza 2-LOD. (Woodland Ensayo de Año 1 Wdl1); Tifton, GA Ensayo de Año 1 Tft1); Woodland, CA Ensayo de Año 3 (Wdl3)).

Rasgos	cM	Efecto aditivo	Efecto de dominancia	2-LOD izquierda	2-LOD derecha
Firmeza_Wdl1	9,9	4,0051	0,4522	8,2	13,4
Firmeza_Tft1	13,9	3,6203	0,1133	13,4	16,9
Firmeza_Wdl3	9,9	5,2477	-0,7243	8,5	13,9
Brix_Wdl1	9,9	-0,8533	0,0026	7,9	14,3
Brix_Tft1	11,9	-1,3193	0,1075	8,1	15,4
Brix_Wdl3	9,9	-0,6574	0,2705	3,7	15,5
Licopeno_Wdl1	11,9	-11,2121	0,9482	5,7	18,8
Licopeno_Tft1	4,7	-9,1304	-20,594	2,7	16,9

Los QTL eran consistentes a lo largo de los tres entornos ensayados y sus intervalos de 2-LOD se solapaban (FIGURA 2; Tabla 5). Los resultados también confirmaron con barridos de un genoma de uno y dos QTL en Rqtl (FIGURA 3) (el análisis presentado en la FIGURA 3B utiliza los datos fenotípicos del experimento del ensayo de Año 1 en Woodland). También se llevó a cabo el análisis y tenía resultados similares utilizando los datos fenotípicos de los experimentos del Ensayo de Año 1 de Tifton y el ensayo de Año 3 de Woodland). El QTL para la firmeza de la carne se localizó en la región genómica flanqueada por NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18), y el pico del QTL estaba en estrecha proximidad de NW0251011 (SEQ ID NO: 12), NW0249132 (SEQ ID NO: 7), NW0248163 (SEQ ID NO: 9) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18). El grupo de unión 9 del mapa genético de la población derivada de 03LB3378-1 x WAS-35-2438 que se alineó después con el grupo de unión 2 de un mapa SNP de consenso de sandía se construyó con tres poblaciones de segregación adicionales (Tabla 3). Los marcadores adicionales que se identificaron dentro del intervalo de QTL incluían: NW0248953 (SEQ ID NO: 2); NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248949 (SEQ ID NO: 4), NW0248646 (SEQ ID NO: 5), NW0249077 (SEQ ID NO: 6), NW0252494 (SEQ ID NO: 8), NW0252274 (SEQ ID NO: 10), NW0248905 (SEQ ID NO: 11), NW0248869 (SEQ ID NO: 13), NW0251470 (SEQ ID NO: 14), NW0251308 (SEQ ID NO: 15), NW0250718 (SEQ ID NO: 16) y NW0248059 (SEQ ID NO: 17). Se descubrió que los marcadores NW0252274 (SEQ ID NO: 10), NW0248646 (SEQ ID NO: 5) y NW0250301 (SEQ ID NO: 3) predecían el fenotipo de carne firme con precisión en diversos germoplasmas de sandía.

Tabla 6. Secuencias de ciertos marcadores de ácido nucleico polimórfico en proximidad al locus de QTL asociado con un fenotipo de carne ultra-firme.

Nombre del marcador	SEQ ID NO:	Posición polimórfica	Secuencia
NW0251646	1	61	gacaactgcaagagaanttttcaacatgaaacattctcagcaaggaatgta tcgagc[a/g]agcggttggttgctaaagcagcagtggtgctattctagtga cataattctatccaa
NW0248953	2	61	ttgaaagtattcgttactgaatgatgaggcgattggcatatcaaaagtctcctt tatt[a/t]gacgaggctaagaggttggtgatgatctggaaggtgtcttctct catattcgttat
NW0250301	3	61	ggtggaactaagctcgacaacaatgagcatcaacctaccgagcgagaaggca ctattgcg[a/g]tagcaacatggaaaagtagtctctgattctcgtgtag actatgtcttaggactt

(continuación)

Nombre del marcador	SEQ ID NO:	Posición polimórfica	Secuencia
NW0248949	4	61	ggactccagccagaaacatagacatccccacccccatctgaaaaactaatattg tcccc[a/g]tgtgagaaaagaaaaaagagcatgggacaaatgagaagg aaacaagaactccctga
NW0248646	5	61	tcaacaataaccctagagaagacctaacaaacactgaaggatttcacatct gaggac[a/c]ttccattctttgaaggatggacaaatgattggtgtactatc aacctcctggatcga
NW0249077	6	45	tgcaggtatccttatgatctgaaatatcatcaagattacacta[a/c]tcgcttg aataatcagaaatttcaaagtgttatttacctgtaattctcaaaaagaagca
NW0249132	7	61	aggataaacaattcacatacacatttccaaatacatttaaaaggaaaattgg agaggg[t/c]caaataagtcaagaggctaagctgtaataataacagcttt gttcaagttaaaccaat
NW0252494	8	61	acaaaattcttccaaaaatgtaaaattctcaattatggaaagttggcgccgga tgcta[t/c]tggttagagccggtgtgtgtgctcatgcaaacctacctcggc gctgtgccgcagcg
NW0248163	9	61	gaaatttaggccaccacatgccttctcgagtccttcagcattgggggtatctt tgta[a/c]tcgagttaccacatgcctgtccgagtccttcaacattgggaacca ttctatatctcg
NW0252274	10	61	cttctcgaaatacttcatctctatggacatcacctccttgaggataaaccttct ttc[t/c]cgtagtcctcgtagggagagagtagtagtaagagactaactgttc atcacctcaa
NW0248905	11	61	ggtcacagattcaatctctaaagttgatgccacaaacttagaacctgcaatta ctacg[a/g]atttgacatccatataccacaaatgaatctacacgtttgttttn aatgaactaaaaa
NW0251011	12	61	atattcgagttggccaaataggttaactattattttcttgagttgttaacatgata ata[t/c]tactcaacgaaatcctatgatagctacacattgagaatgcataaac aaactcgtattg
NW0248869	13	61	aaaatttatgtacaggctgttacagttcgtccttattctgctgcagctccctcgt acg[t/g]tttgcagaggagccccagatgtttgccattgaattact
NW0251470	14	61	gtttggaactgttatatcccntaaactgctcaatgttatctcagagtgcattct acca[a/t]taagctcctgttctggtncaaaaaacactccaccttcnattt ttnggtctctct
NW0251308	15	61	caattgctgcagatgtaactgaaagaacaatcaangttctaggatggcatcatt ttgagt[t/c]tagtttctaataaagttcatctgttttngatgtgctaaatca gtggaggcnth
NW0250718	16	61	tgacggcggttgctgcattgctcatggctgtatggttcatgtctacgattggatgc tcga[t/c]gaacacccctccgatcaatctcgattatcagcgagtcaacgatgttg ggtggatcgatgct

(continuación)

Nombre del marcador	SEQ ID NO:	Posición polimórfica	Secuencia
NW0248059	17	61	acttaattgaatctaatagatgaagttcaattacgcaagtacaaaaanttacta gttaat[a/g]tgtcatcacgcaagtcagatctttatgcatggcgctccaat ttgtatcagagacc
NW0250266	18	61	gtatctttgtgtccgtattagcttgcgacctctcgagtgggtatagttgta cg[t/c]tttgatgttttctatgttggtatgagtggtgggattctttcgagc attcatgtt

Las bases de nucleótido polimórficas se designan en el Listado de Secuencias proporcionado en el presente documento de acuerdo con el Estándar WIPO, Tabla 1, de la siguiente manera: r=g o a (purina); y=t/u o c (pirimidina); m=a o c; (amino); k=g o t/u (ceto); s=g o c (interacciones fuertes enlaces-3 H); w=a o t/u (interacciones débiles enlaces-2 H); b=g o c o t/u (no a); d=a o g o t/u (no c); h=a o c o t/u (no g); v=a o g o c (no t, no u); y n=a o g o c o t/u (desconocido, u otro; cualquiera). También se indican las eliminaciones como se proporciona en la Tabla 3.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Monsanto Company Juarez, Benito King, Joe Bachlava, Eleni Wentzell, Adam Mills, Jeff
- <120> Procedimientos y composiciones para la firmeza de la sandía
- <130> 42-18(57941)
- 15 <160> 18
- <170> PatentIn version 3.5
- 20 <210> 1
<211> 120
<212> ADN
<213> Citrullus lanatus
- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n es a, c, g, o t
- 30 <220>
<221> alelo
<222> (61)..(61)
<223> r = g o a o una eliminación
- 35 <400> 1
- gacaactgca agagaanttt ttcaacatga aacattcttc agcaaggaat gttatcgagc 60**
- ragcggtttgg gttgctaaag cagcagtggg ctattcttag tgaaacataa ttctatccaa 120**
- 40 <210> 2
<211> 121
<212> ADN
<213> Citrullus lanatus
- 45 <220>
<221> alelo
<222> (61)..(61)
<223> w = a o t/u

ES 2 727 672 T3

	<400> 2		
	ttgaaagtta ttcgtttact gaatgatgag gcgattggca tatcaaaagt ctcttttatt	60	
	wgacgagget aagagttgtg gatatgatct ggaagttgtc tctttctctc atattcgta	120	
5	t	121	
	<210> 3		
	<211> 121		
	<212> ADN		
10	<213> Citrullus lanatus		
	<220>		
	<221> alelo		
	<222> (61)..(61)		
15	<223> r = g o a		
	<400> 3		
	ggtggaacta agctcgacaa caatgagcat caacctaccg agcgagaagg cactattgcg	60	
	rttagcaaca tggaaaagta gtctgatct tctttctctg gtagactatg tcttaggact	120	
	t	121	
20	<210> 4		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Citrullus lanatus		
	<220>		
25	<221> alelo		
	<222> (61)..(61)		
	<223> r = g o a		
	<220>		
30	<221> misc_feature		
	<222> (77)..(77) <223> n es a, c, g, o t		
	<400> 4		
	ggactccagc cagaacatag acatccccc ccccatctg aaaaactaat attgtcccca	60	
	rtgtgagaaa agaaaanaag agcatgggac aaatgagaag ggaaacaaag aacttcocctg	120	
35	a	121	
	<210> 5		
	<211> 121		
	<212> ADN		
40	<213> Citrullus lanatus		
	<220>		
	<221> alelo		
45	<222> (61)..(61)		
	<223> m = a o c		
	<400> 5		
	tcaacaataa ccctagagaa gaccttaaca aacacttgaa ggattttcac atctgaggac	60	
	mtttccattc tctttgaagg atggacaaat gattgggtgt actatcaacc tcttgatcg	120	
	a	121	

5	<210> 6		
	<211> 105		
	<212> ADN		
	<213> Citrullus lanatus		
	<220>		
10	<221> alelo		
	<222> (45)..(45)		
	<223> m = a o c o una eliminación		
	<400> 6		
	tgcagggtatc cttatgatct gaaatatcat caagattaca cttamtcgct tgaataatca	60	
15	gaaattttcaa agtggtttatt tacctgtaat cttcaaaaag aagca	105	
	<210> 7		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Citrullus lanatus		
20	<220>		
	<221> alelo		
	<222> (61)..(61)		
	<223> y = t/u o c o una eliminación		
	<400> 7		
25	aggataaaca aattcacata cacttttccc aaatacattt aaaaggaaaa ttggagaggg	60	
	ycaataaagt caagaggcta agctgtaatg aatataacag ctttgttcaa gttaaaccaa	120	
	t	121	
	<210> 8		
	<211> 120		
30	<212> ADN		
	<213> Citrullus lanatus		
	<220>		
	<221> alelo		
	<222> (61)..(61)		
35	<223> y = t/u o c o una eliminación		
	<400> 8		
40	acaaaatttct ttccaaaaat gtaaaatttct caattatgga aagttggcgc cgcgatgcta	60	
	ytggctagag ccgcggtgct gtgcgtcatg caaacctacc ctccgcgctg tgccgcagcg	120	
	<210> 9		
	<211> 121		
	<212> ADN		
45	<213> Citrullus lanatus		
	<220>		
	<221> alelo		
	<222> (61)..(61)		
	<223> m = a o c o una eliminación		
50	<400> 9		

	gaaatttagg ccacccacat gccttcttgc agtcttccag cattgggggt tatctttgta	60
	mtcgagttac ccacatgcct tgtccgagtc cttcaacatt gggaaccatt tctatatctc	120
	g	121
5	<210> 10 <211> 120 <212> ADN <213> Citrullus lanatus	
10	<220> <221> alelo <222> (61)..(61) <223> y = t/u o c	
	<400> 10	
	cttctcggaa atacttcac tctatggaca tcaccttcc tgaggataaa cccttcttcc	60
15	ycgttagtcc tcgtcaggga gagagtagta gtgaagagac taactgttca tcaccttcaa	120
20	<210> 11 <211> 121 <212> ADN <213> Citrullus lanatus	
25	<220> <221> alelo <222> (61)..(61) <223> r = g o a	
30	<220> <221> misc_feature <222> (108)..(108) <223> n es a, c, g, o t	
	<400> 11	
	ggtcacagat tcaatctcta aagttgtatg ccaccaaact tagaacctgc aattactacg	60
	ratttgacat ccatatacca caaatgaatc tacacgtttg ttgttttnaa tgaactaaaa	120
35	a	121
40	<210> 12 <211> 120 <212> ADN <213> Citrullus lanatus	
	<220> <221> alelo <222> (61)..(61) <223> y = t/u o c	
45	<400> 12	
	atattcgagt tggccaaata ggtaacttat tattttcttg agtttggttaa catgataata	60
	ytactcaacg aaatcctatg atagctacac atttgagaat gcataaacia actcgtattg	120
50	<210> 13 <211> 99 <212> ADN	

<213> Citrullus lanatus

<220>
 <221> alelo
 5 <222> (61)..(61)
 <223> k = g o t/u

<400> 13

aaaattttat gtacaggctg ttacagttcg tcctttatct gctgtcagct ccctogtaog 60

10 **ktttgcagag gagccccaga tgtttgccat tgaattact 99**

<210> 14
 <211> 120
 <212> ADN
 15 <213> Citrullus lanatus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 20 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> alelo
 <222> (61)..(61)
 25 <223> w = a o t/u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (81)..(81)
 30 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (104)..(104)
 35 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (111)..(111)
 40 <223> n es a, c, g, o t

<400> 14

gtttggaact gttatatccc cntaaactgc tcaatgttat ctacagagtga gottctacca 60

45 **wtaaagctcc ttgttctggt nccaaaaaac acttccacct tccnattttt nggtctctct 120**

<210> 15
 <211> 120
 <212> ADN
 50 <213> Citrullus lanatus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 55 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> alelo
 <222> (61)..(61)
 60 <223> y = t/u o c

<220>

	<221> misc_feature		
	<222> (94)..(94)		
	<223> n es a, c, g, o t		
5	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (117)..(117)		
	<223> n es a, c, g, o t		
10	<400> 15		
	caattgctgc agatgtaact gaaagaacaa tcaangttct aggatggcat cattttgagt	60	
	ytagtttcct aataaagtgt tcatctgtgt tttngatgtg ctaaatacagt ggaggcnttt	120	
15	<210> 16		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Citrullus lanatus		
20	<220>		
	<221> alelo		
	<222> (61)..(61)		
	<223> y = t/u o c		
25	<400> 16		
	tgacggcggt tgctgcattg ctcattggctg tatggttcat gtctacgatt ggatgctoga	60	
	ygaacaccct ccgatcaatc tcgattatca gcgagtcaac gatgttgggt ggatcgatgc	120	
	t	121	
30	<210> 17		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Citrullus lanatus		
35	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (48)..(48)		
	<223> n es a, c, g, o t		
40	<220>		
	<221> alelo		
	<222> (61)..(61)		
	<223> r = g o a		
45	<400> 17		
	acttaattga atctaataga tgaagttcaa ttacgcaagt acaaaaantt actagttaat	60	
	rtgtcataca cgcaagtcaa agatctttat gcatgggtgcc tccaatttgt tatcagagac	120	
	c	121	
50	<210> 18		
	<211> 121		
	<212> ADN		
	<213> Citrullus lanatus		
55	<220>		
	<221> alelo		
	<222> (61)..(61)		
	<223> y = t/u o c		

ES 2 727 672 T3

<400> 18

gtatcttttg tgcctgtatt agcttgcgac ctcttcgagt ggttatagtt aggttgtag	60
ytttgatggt tttctatggt ggtatgagt gcttggggat tcttttcgga gcattcatgt	120
t	121

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección en al menos una planta de sandía de un genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme que comprende la detección en al menos una planta de sandía de un alelo de al menos un ácido nucleico polimórfico que está unido genéticamente a un QTL asociado con un tipo de carne de sandía firme y los mapas dentro de 5 cM o 1 cM de dicho QTL asociado con un fenotipo de carne de sandía firme, en el que dicho QTL asociado con un fenotipo de carne de sandía firme está en una región genómica flanqueada por los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho QTL asociado con un tipo de carne de sandía firme se puede identificar utilizando uno o más alelos unidos seleccionados de entre:
 - al menos un alelo con una eliminación en la posición 61 del ácido nucleico polimórfico de NW0251464 (SEQ ID NO: 1);
 - al menos un alelo en el estado alélico T del ácido nucleico polimórfico de NW0248953 (SEQ ID NO: 2);
 - al menos un alelo en el estado alélico G del ácido nucleico polimórfico de NW0250301 (SEQ ID NO: 3);
 - al menos un alelo en el estado alélico A del ácido nucleico polimórfico de NW0248949 (SEQ ID NO: 4);
 - al menos un alelo en el estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0248646 (SEQ ID NO: 5);
 - al menos un alelo con una eliminación en la posición 45 del ácido nucleico polimórfico de NW0249077 (SEQ ID NO: 6);
 - al menos un alelo con una eliminación en la posición 61 del ácido nucleico polimórfico de NW0249132 (SEQ ID NO: 7);
 - al menos un alelo con una eliminación en la posición 61 del ácido nucleico polimórfico de NW0252494 (SEQ ID NO: 8);
 - al menos un alelo con una eliminación en la posición 61 del ácido nucleico polimórfico de NW0248163 (SEQ ID NO: 9);
 - al menos un alelo en el estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0252274 (SEQ ID NO: 10);
 - al menos un alelo en el estado alélico G del ácido nucleico polimórfico de NW0248905 (SEQ ID NO: 11);
 - al menos un alelo en el estado alélico T del ácido nucleico polimórfico de NW0251011 (SEQ ID NO: 12);
 - al menos un alelo en el estado alélico G del ácido nucleico polimórfico de NW0248869 (SEQ ID NO: 13);
 - al menos un alelo en el estado alélico T del ácido nucleico polimórfico de NW0251470 (SEQ ID NO: 14);
 - al menos un alelo en el estado alélico T del ácido nucleico polimórfico de NW0251308 (SEQ ID NO: 15);
 - al menos un alelo en el estado alélico T del ácido nucleico polimórfico de NW0250718 (SEQ ID NO: 16);
 - al menos un alelo en el estado alélico A del ácido nucleico polimórfico de NW0248059 (SEQ ID NO: 17); y
 - al menos un alelo en el estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0250266 (SEQ ID NO: 18).
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho un ácido nucleico polimórfico que está unido genéticamente a un QTL está dentro de 5 cM de al menos un alelo con una eliminación en la posición 61 del ácido nucleico polimórfico de NW0251464 (SEQ ID NO: 1); al menos un alelo del estado alélico G del ácido nucleico polimórfico de NW0250301 (SEQ ID NO: 3); al menos un alelo del estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0248646 (SEQ ID NO: 5); al menos un alelo del estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0252274 (SEQ ID NO: 10); o al menos un alelo del estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0250266 (SEQ ID NO: 18).
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho QTL asociado con un tipo de carne de sandía firme se puede identificar utilizando dos alelos unidos.
5. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho QTL asociado con un tipo de carne de sandía firme se puede identificar utilizando tres alelos unidos que comprenden el grupo de NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248646 (SEQ ID NO: 5), y NW0252274 (SEQ ID NO: 10).
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente las etapas de:
 - (ii) identificación de al menos una planta de sandía en la que se ha detectado un alelo de al menos un ácido nucleico polimórfico que está unido genéticamente a un QTL asociado con un tipo de carne de sandía firme, indicando que la planta de sandía comprende un genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme; y
 - (iii) selección de una planta de sandía determinada de una población de plantas.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende la etapa de:
 - (i) la detección en la al menos una planta de sandía de un alelo de al menos un ácido nucleico polimórfico que se asocia con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme, en el que el ácido nucleico polimórfico está en una región genómica flanqueada por los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1) y NW0250266 (SEQ ID NO: 18).
8. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente las etapas de:
 - (ii) identificación de al menos una planta de sandía en la que se ha detectado un genotipo asociado con un

fenotipo de carne de sandía ultra-firme, indicando que la planta de sandía comprende un genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme; y
(iii) selección de una planta de sandía determinada de una población de plantas.

9. El procedimiento de la reivindicación 7 u 8, en el que

- 5 (i) el fruto de dicha planta de sandía que comprende al menos un alelo que está asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme tiene una carne que resiste una presión de al menos aproximadamente 15,6 N; o
(ii) el corte de carne del fruto de dicha planta de sandía pierde menos de aproximadamente un cuatro por ciento de agua después de tres días de almacenamiento a 4 °C; o
(iii) el ácido nucleico polimórfico se localiza en una región genómica flanqueada por:

- 10 a) los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1), y NW0251011 (SEQ ID NO: 12);
b) los loci NW0251464 (SEQ ID NO: 1), y NW0252274 (SEQ ID NO: 10);
c) los loci NW0248953 (SEQ ID NO: 2), y NW0250266 (SEQ ID NO: 18);
d) los loci NW0248953 (SEQ ID NO: 2), y NW0251011 (SEQ ID NO: 12);
e) los loci NW0248953 (SEQ ID NO: 2), y NW0252274 (SEQ ID NO: 10);
15 f) los loci NW0250301 (SEQ ID NO: 3), y NW0250266 (SEQ ID NO: 18);
g) los loci NW0250301 (SEQ ID NO: 3), y NW0251011 (SEQ ID NO: 12); o
h) los loci NW0250301 (SEQ ID NO: 3), y NW0252274 (SEQ ID NO: 10); o

(iv) combinaciones de (i), (ii) y (iii).

10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que

- 20 (i) al menos uno de dichos ácidos nucleicos polimórficos se selecciona de entre NW0248953 (SEQ ID NO: 2), NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248949 (SEQ ID NO: 4), NW0248646 (SEQ ID NO: 5), NW0249077 (SEQ ID NO: 6), NW0249132 (SEQ ID NO: 7), NW0252494 (SEQ ID NO: 8), NW0248163 (SEQ ID NO: 9), NW0252274 (SEQ ID NO: 10), NW0248905 (SEQ ID NO: 11), NW0251011 (SEQ ID NO: 12), NW0248869 (SEQ ID NO: 13), NW0251470 (SEQ ID NO: 14), NW0251308 (SEQ ID NO: 15), NW0250718 (SEQ ID NO: 16), y NW0248059 (SEQ ID NO: 17); o
25 (ii) se detectan alelos de al menos dos ácidos nucleicos polimórficos que se asocian con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme y en el que dichos ácidos nucleicos polimórficos se seleccionan de entre NW0248953 (SEQ ID NO: 2), NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248949 (SEQ ID NO: 4), NW0248646 (SEQ ID NO: 5), NW0249077 (SEQ ID NO: 6), NW0249132 (SEQ ID NO: 7), NW0252494 (SEQ ID NO: 8), NW0248163 (SEQ ID NO: 9), NW0252274 (SEQ ID NO: 10), NW0248905 (SEQ ID NO: 11), NW0251011 (SEQ ID NO: 12), NW0248869 (SEQ ID NO: 13), NW0251470 (SEQ ID NO: 14), NW0251308 (SEQ ID NO: 15), NW0250718 (SEQ ID NO: 16), y NW0248059 (SEQ ID NO: 17).

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que al menos uno de dichos ácidos nucleicos polimórficos se selecciona de entre NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248646 (SEQ ID NO: 5) y NW0252274 (SEQ ID NO: 10).

- 35 12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que se detectan alelos de al menos dos ácidos nucleicos polimórficos que se asocian con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme y en el que dichos al menos dos ácidos nucleicos polimórficos se seleccionan de entre NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248646 (SEQ ID NO: 5), y NW0252274 (SEQ ID NO: 10).

- 40 13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que se detectan dichos alelos que están asociados con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme y comprenden NW0250301 (SEQ ID NO: 3), NW0248646 (SEQ ID NO: 5), y NW0252274 (SEQ ID NO: 10).

14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el genotipo asociado con un genotipo de carne de sandía ultra-firme comprende el que tiene al menos uno de: al menos un alelo del estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0252274 (SEQ ID NO: 10); al menos un alelo del estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0248646 (SEQ ID NO: 5); o al menos un alelo del estado alélico G del ácido nucleico polimórfico de NW0250301 (SEQ ID NO: 3).
45

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme comprende al menos un alelo del estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0252274 (SEQ ID NO: 10); al menos un alelo del estado alélico C del ácido nucleico polimórfico de NW0248646 (SEQ ID NO: 5); y al menos un alelo del estado alélico G del ácido nucleico polimórfico de NW0250301 (SEQ ID NO: 3).
50

16. Un oligonucleótido aislado para la detección en al menos una planta de sandía de un genotipo asociado con un fenotipo de carne de sandía ultra-firme

(a) que comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada de entre las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, y 18, y cualquier variante alélica específica de las mismas; o

(b) que comprende un fragmento de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, o 18, que contiene una variante alélica específica de las mismas y que tiene al menos 18 nucleótidos de longitud.

5 17. El oligonucleótido aislado de la reivindicación 16, en el que el fragmento que contiene dicha variante alélica tiene al menos 20, al menos 22, al menos 25 o al menos 30 nucleótidos de longitud.

18. El oligonucleótido aislado de la reivindicación 16, en el que dicho oligonucleótido comprende un fragmento de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, 5, o 10 que contiene una variante alélica específica de las mismas y que tiene al menos 18 nucleótidos de longitud.

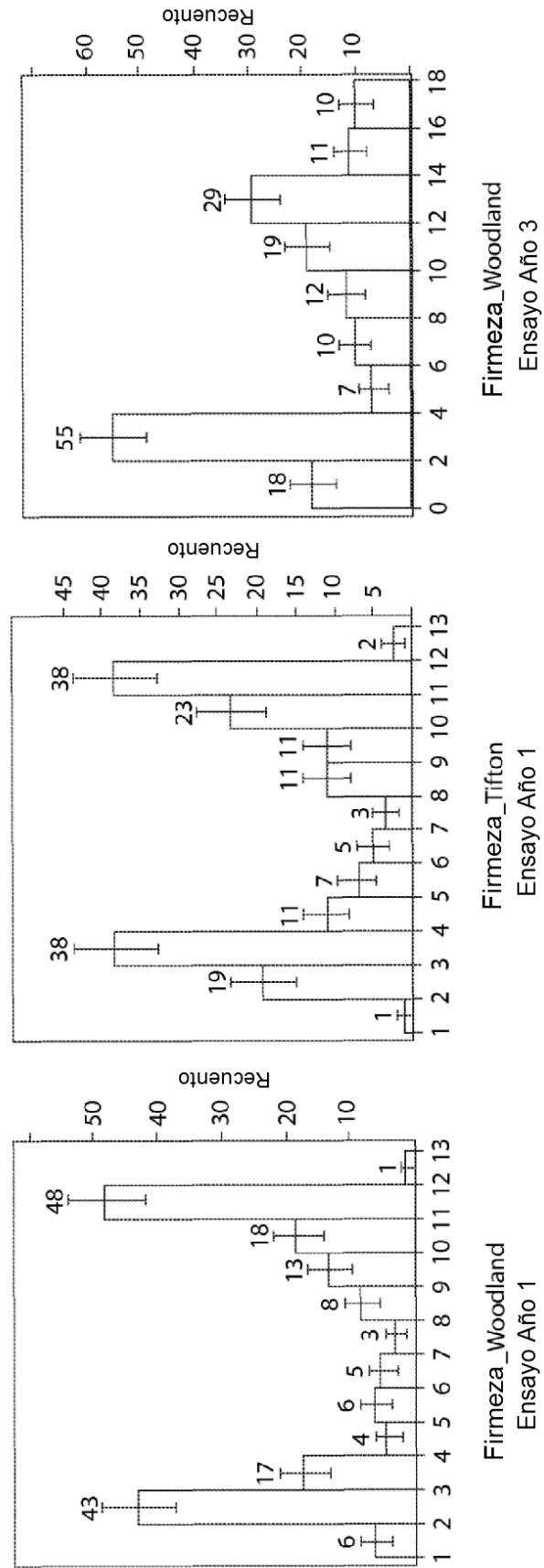


FIG. 1

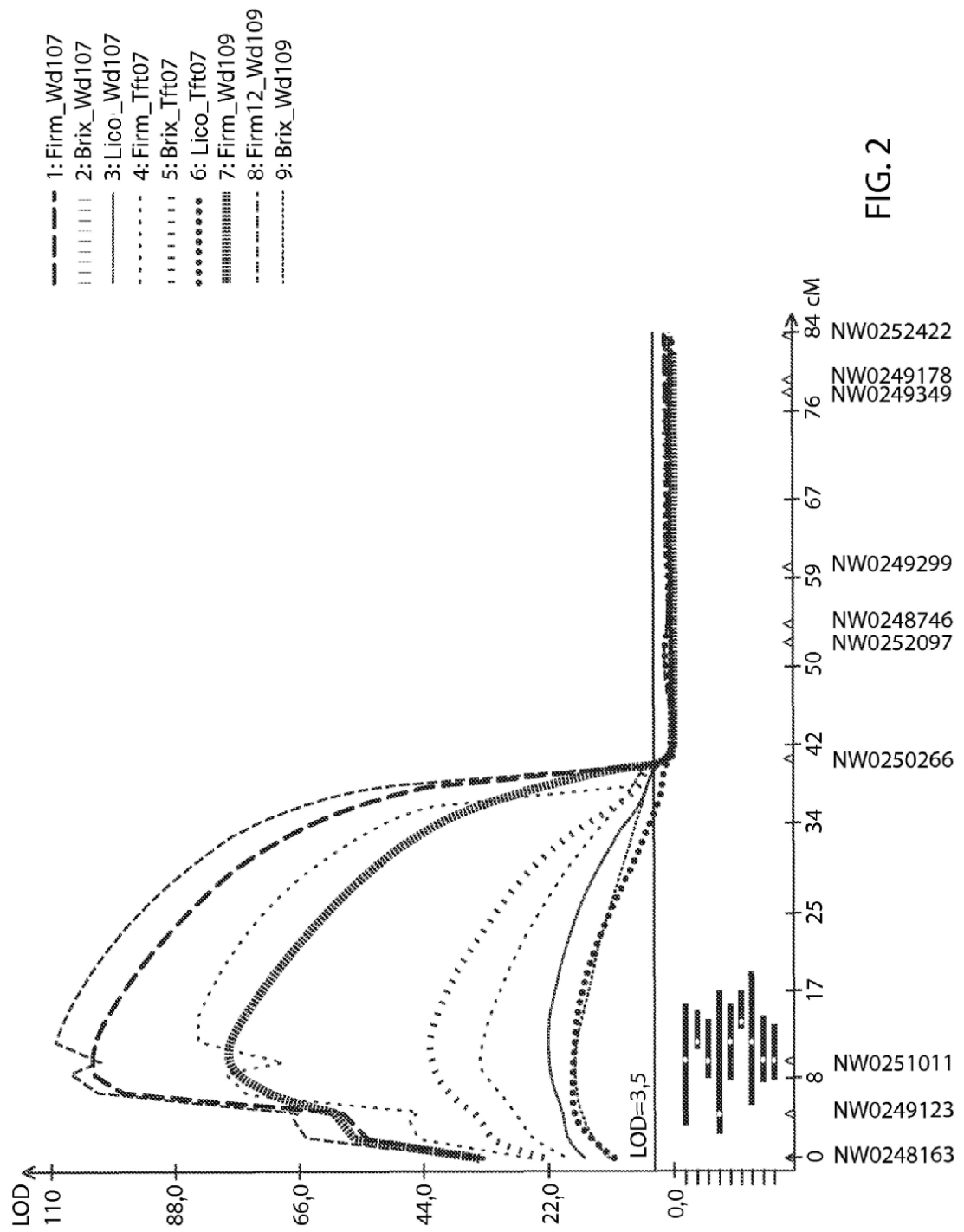


FIG. 2

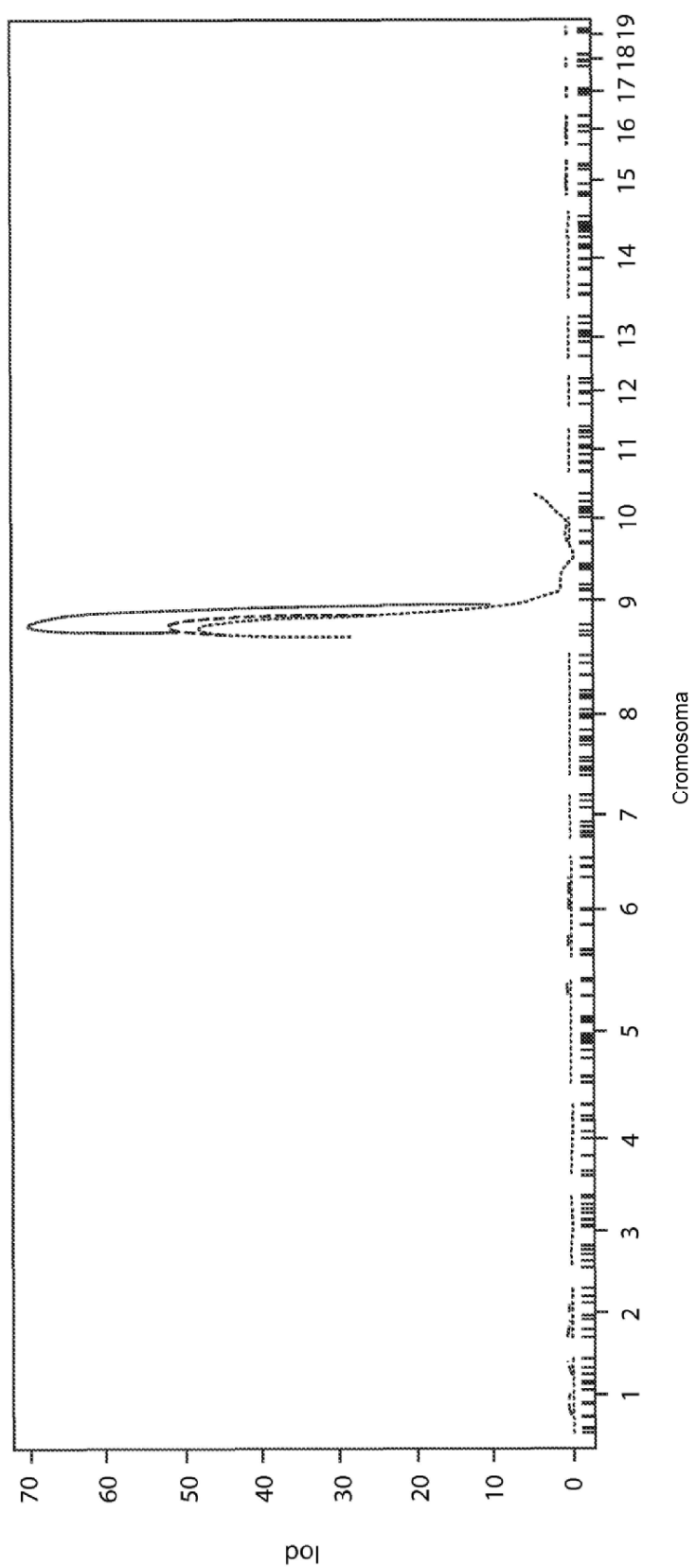


FIG. 3A

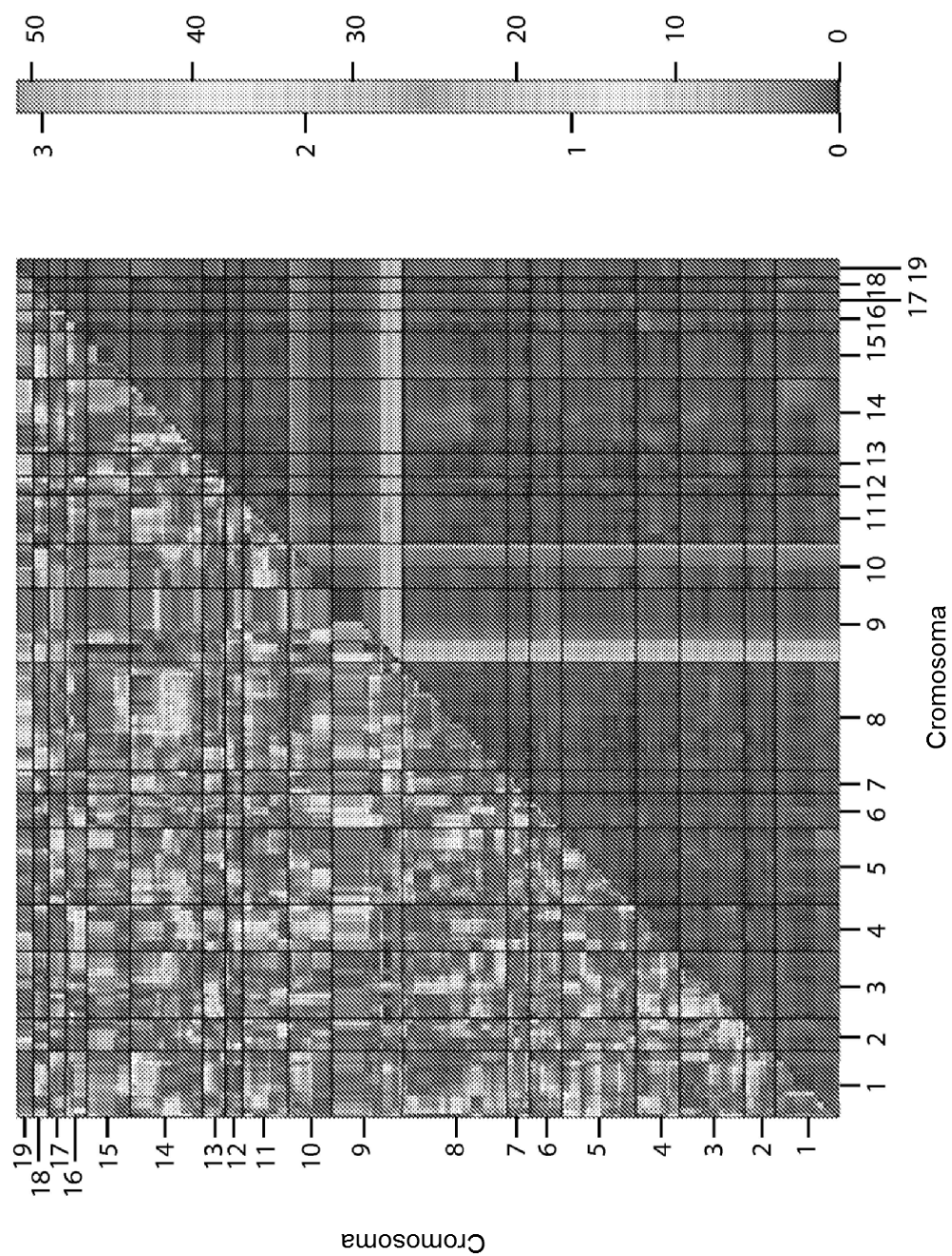


FIG. 3B