

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 217**

51 Int. Cl.:

A01H 3/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2008.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2015 PCT/IL2015/050252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15136532**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2015 E 15761575 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2022 EP 3116301**

54 Título: **Plantas de melón con mejor rendimiento de frutos**

30 Prioridad:

10.03.2014 US 201461950315 P

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

05.04.2023

73 Titular/es:

**THE STATE OF ISRAEL, MINISTRY OF
AGRICULTURE & RURAL DEVELOPMENT,
AGRICULTURAL RESEARCH ORGANIZATION
(ARO) (VOLCANI CENTER) (100.0%)
Volcani Center P.O. Box 15159
7528809 Rishon-LeZion, IL**

72 Inventor/es:

**TADMOR, YAAKOV;
BURGER, YOSEF;
MEIR, AYALA;
SAAR, UZI;
BAUMKOLER, FABIAN;
SCHAFFER, ARTHUR A.;
KATZIR, NURIT;
OZ, IDO y
LAVEE, TAMAR**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 938 217 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

Plantas de melón con mejor rendimiento de frutos

La presente descripción, en algunos aspectos de la misma, se refiere a plantas de melón que tienen frutos pequeños sin semillas con mejor rendimiento de frutos y métodos para generarlos.

- 5 La partenocarpia, la producción de frutos sin semillas, se puede lograr en muchos cultivos mediante la adición de los reguladores del crecimiento vegetal auxina, citoquinina o giberelina. Se ha demostrado que la aplicación exógena de auxina o giberelina a las flores no fertilizadas en varias especies vegetales induce el cuajado de frutos sin polinización, lo que da como resultado la producción de frutos partenocárpicos. En las investigaciones anteriores que intentaban producir frutas sin semillas se han utilizado con cierto éxito la fitomejora tradicional y la aplicación exógena de
- 10 hormonas. Sin embargo, la aplicación exógena de hormonas vegetales es un procedimiento que requiere mucha mano de obra y la fitomejora tradicional es un procedimiento a largo plazo. Además, al menos algunos de los intentos previos para producir ciertos frutos sin semillas han dado como resultado un bajo número de frutos sin semillas y/o frutos sin semillas relativamente pequeños en comparación con los frutos con semillas normales. En la mayoría de los casos, esto condujo a una reducción significativa de la producción en variedades de frutos pequeños.
- 15 *Cucumis melo* muestra una diversidad extrema en los rasgos frutales. El fruto del melón varía en tamaño, forma, color exterior, aroma y características de la pulpa, como el contenido de azúcar, la acidez y la pigmentación. Aún así, existe una demanda creciente de nuevos tipos de frutos por parte de los mercados alimentarios modernos. En el melón, el cuajado y el número de frutos es una característica gobernada principalmente por las hormonas. El cuajado se ve afectado por la comunicación hormonal que surge del éxito o fracaso del desarrollo del fruto desde la flor femenina
- 20 anterior en la rama, aunque la cantidad general de frutos por planta es bastante constante. Típicamente, la mayoría de las variedades de melón producirán de 1 a 5 frutos por planta en el campo.

Existe desde hace mucho tiempo en la técnica una necesidad de medios y métodos eficaces y económicos para la producción de frutos sin semillas, en concreto con un buen rendimiento y calidad en comparación con los frutos sin semillas de la técnica anterior.

- 25 La técnica anterior incluye la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 20120324597 y la solicitud de patente internacional WO 2011/018785.

- La patente coreana KR 20040082448 se refiere a un método para preparar un encurtido al conservar un melón (*Cucumis melo* L.) en una solución de salmuera que contiene lactato de calcio. El encurtido de melón satisface las preferencias de los consumidores al mantener el sabor y el aroma muy próximos a productos alimenticios tales como
- 30 pizza, hamburguesa, pollo frito o similares. CONSTITUCIÓN: Se le añade a un melón sal y del 0,1 al 0,5 % en peso de lactato de calcio, en función del peso del melón, para que la concentración final de sal sea del 20 al 30 %. El melón salado se lava, se corta en rodajas de un grosor predeterminado y se sazona con un líquido sazonador durante 2 a 3 días. El condimento líquido contiene del 5,50 al 14,30 % en peso de agua, del 24,50 al 33,30 % en peso de vinagre, del 14,50 al 23,30 % en peso de jarabe de almidón, del 40,00 al 60,70 % en peso de alta fructosa, del 4,50 al 13,30 %
- 35 en peso de sorbitol, del 0,01 al 8,81 % en peso de glutamato monosódico, del 0,54 al 9,34 % en peso de ácido tartárico, del 0,90 al 9,70 % en peso de vitamina C, del 0,34 al 9,15 % en peso de ácido cítrico, del 0,40 al 9,20 % en peso de ácido málico y del 0,01 al 8,81 % en peso de pigmentos.

- GALPAZ NAVOT ET AL, se refiere a «Genetic and chemical characterization of an EMS induced mutation in *Cucumis melo* CRTISO gene» ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, (201308), vol. 539, núm. 2, doi: 10.1016/J.ABB.2013.08.006, ISSN 0003-9861, páginas 117-125.
- 40

VALANTIN, M. et al., se refiere a «Effect of fruit load on partitioning of dry matter and energy in cantaloupe (*Cucumis melo* L.)» Annals of Botany, (19991231), vol. 84, núm. 2, ISSN 0305-7364, páginas 173-181.

GRUMET, R. et al., se refiere a «News insights into reproductive development in melon (*Cucumis melo* L.)» *Int J Plant Dev Biol*, (20071231), vol. 1, páginas 253-264.

- 45 HAYATA, Y. et al., se refiere a «CPPU and BA, with and without pollination, affect set, growth and quality of muskmelon fruit», HortScience, (20000831), vol. 35, núm. 5, páginas 868-870.

«PREDICTED: zinc finger protein 8-like [*Cucumis melo*]» NCBI, (20140625), número de acceso a la base de datos XP_008443018, URL: ncbi, XP055224128 [T] 27,28, el documento completo.

- 50 LEVI, A. et al., se refiere a «Genes expressed during the development and ripening of watermelon fruit» *Plant cell reports*, (2006062720060627), vol. 25, núm. 11, ISSN 1432-203x, páginas 1233-1245, resumen, tabla 1 (página 1241), página 1244 (columna izquierda).

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una planta de *Cucumis melo* o una parte de la misma, en donde la planta tiene más de 12 frutos, en donde dicho fruto no tiene semillas, en donde ambos alelos del genoma de la planta tienen una

mutación de pérdida de función en la SEQ ID n.º 7 que da como resultado un rasgo sin semillas.

La presente invención se refiere también a una planta de *Cucumis melo* que tiene una forma heterocigota de la SEQ ID n.º 7 en la que un alelo de la SEQ ID n.º 7 tiene una mutación de pérdida de función tal que tras la autopolinización, el 25 % de la F1 da más de 12 frutos, en donde dichos frutos no tienen semillas.

5 Preferiblemente, la planta porta más de 15 frutos o porta más de 20 frutos.

Preferiblemente, ambos alelos de dicha SEQ ID n.º 7 tienen una mutación F/I en la posición 97 de la misma.

10 La presente invención se refiere también a un esqueje de una planta de *C. melo*, en donde ambos alelos del genoma del esqueje tienen una mutación de pérdida de función en la SEQ ID n.º 7, de manera que la planta desarrollada a partir del esqueje porta más de 12 frutos, en donde dichos frutos no tienen semillas; o en el que el esqueje tiene una forma heterocigota de la SEQ ID n.º 7, de manera que tras la autopolinización de la planta desarrollada a partir del esqueje, el 25 % de la F1 porta más de 12 frutos, en donde dichos frutos no tienen semillas.

15 Preferiblemente, muchas semillas de *C. melo* que tienen una forma heterocigótica de la SEQ ID n.º 7 en las que un alelo de la SEQ ID n.º 7 tiene una mutación de pérdida de función que al plantarla provoca un fenotipo de cultivo mejorado de fruta en el 25 % de las plantas derivadas de las mismas y en donde dicho 25 % de las plantas portan más de 5 frutos, en donde dichos frutos no tienen semillas.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia que se presenta en la SEQ ID n.º 9.

La presente invención también se refiere a un polipéptido aislado que comprende una secuencia como la presentada en la SEQ ID n.º 8.

20 La presente invención se refiere también a un método de selección asistida por marcadores de una planta de *C. melo* que tiene mejorada la producción de frutos o que tiene una progenie con una producción mejorada, en donde el método comprende usar oligonucleótidos que distinguen entre la forma mutada y no mutada de la SEQ ID n.º 7 para analizar la presencia de una mutación de pérdida de función en ambos alelos de la SEQ ID n.º 7, en donde la presencia de dicha mutación en ambos alelos de la SEQ ID n.º 7 es indicativa de que la planta o su descendencia producirá más
25 de 5 frutos sin semillas.

Breve descripción de las diferentes vistas de los dibujos

30 Algunos aspectos de la descripción se describen en la presente memoria, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con el propósito de ilustrar la explicación de aspectos de la descripción. A este respecto, la descripción junto con los dibujos hace evidente a los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica los aspectos de la descripción.

En los dibujos:

La figura 1 es una fotografía de una planta 'superfructífera' ('sf') con frutos en el campo.

La figura 2 es una fotografía del interior de varios tipos de frutos 'sf'.

35 La figura 3 es una fotografía de todos los frutos de una sola planta representativa de 'sf'.

Las figuras 4A-C son gráficos de barras que ilustran el desempeño de campo de segregantes F₂ 'sf' y de tipo silvestre procedentes de cuatro cruces independientes. Las líneas continuas y discontinuas horizontales representan los valores medios de todos los tipos silvestres y 'sf' respectivamente. A: número medio de frutos; B: peso medio del fruto; C: peso medio de frutos por planta (rendimiento).

40 Las figuras 5A-B son gráficos de barras que ilustran la calidad de los segregantes F₂ 'sf' y de tipo silvestre del cruce CEZ x 'sf'. A: Grados Brix (TSS) promedio de 10 frutos CEZ, y de segregantes 'sf' y de tipo silvestre; B: Contenido medio de β-carotenos de 10 frutos de CEZ, y de segregantes 'sf' y de tipo silvestre.

45 La figura 6 es una fotografía de los productos de la digestión con *Apol* de un producto de PCR de 213 pares de bases (pb) amplificado a partir del ADN de (de izquierda a derecha) 'sf', 'CEZ' y sus plantas F₁. El tamaño en pares de bases (pb) de los fragmentos de ADN aparece a la izquierda. El cebador directo TAGACATGAGCCGCATCTGA (SEQ ID n.º 3) y el cebador inverso GAACGTGGCAACAACAACAA (SEQ ID n.º 4) se utilizaron para la amplificación por PCR.

50 La figura 7 es un alineamiento del motivo de 'dedo de Zn' (ZF, del inglés *Zn-finger*) de 'sf' (MELO3C009603) que muestra el cambio de aminoácido de 'F⁹⁷' a 'I' (recuadro rojo). Los dos aminoácidos de cisteína e histidina del C₂H₂ están en negrita. CHYCCRNFPSTQALGGHQNAH (SEQ ID n.º 5); CHYCCRNIPSTQALGGHQNAH (SEQ ID n.º 6).

Las figuras 8A-B son gráficos que ilustran la expresión de *MELO3C009603* (gen *sf*). Figura 8A: expresión digital obtenida por ARN-Seq de *MELO3C009603* (gen *sf*) en las masas de 'sf' y del tipo silvestre; figura 8B: análisis cualitativo por RT-PCR de la expresión relativa (gen *APR1* como referencia) de *MELO3C009603* en los tejidos que comprendían cada una de las masas.

5 La figura 9 es un diagrama de Venn que muestra todos los genes expresados diferencialmente (DEG, del inglés *differentially expressed genes*) en las tres poblaciones segregantes y los que se solapan.

La figura 10A es un gráfico que ilustra la expresión digital obtenida por ARN-Seq de *MELO3C021150* (gen de la nucela de la semilla) en masas isogénicas de 'sf' y de tipo silvestre (CEZ);

10 La figura 10B es un gráfico que ilustra la expresión relativa de *MELO3C021150* en los tejidos que comprendían las masas isogénicas, analizadas por qRT-PCR (gen *APR1* como referencia).

Las figuras 11A-B proporcionan la secuencia del ADN complementario de tipo silvestre (FIG. 11A: SEQ ID n.º 7) y la secuencia de aminoácidos mutada (FIG. 11B: SEQ ID n.º 8) de *MELO3C009603* en las plantas mutadas. Figura 11A: el primer ATG está resaltado en amarillo y el codón de parada TAA está resaltado en rojo. El 'TTC' que codifica la 'F' en el tipo silvestre está en negrita y la 'T' que está mutada a una 'A' en la 'sf' está coloreada en rojo; figura 11B: secuencia de la proteína del gen de 'sf'. El dominio de dedo de zinc está coloreado de azul, C₂ y H₂ de verde y el aminoácido mutado 'I' en rojo. El motivo QAALGH dentro del dominio ZF está subrayado.

15

Descripción de aspectos específicos de la descripción

La presente descripción, en algunos aspectos de la misma, se refiere a plantas de melón que tienen mayor producción de frutos y métodos para generarlas.

20 Antes de explicar en detalle al menos un aspecto de la descripción, debe entenderse que la descripción no está necesariamente limitada en su aplicación por los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados mediante los ejemplos. La descripción admite otros aspectos o se puede poner en práctica o llevar a cabo de varias maneras.

25 Entre las cucurbitáceas, *C. melo* es una de las cucurbitáceas cultivadas más importantes. Se cultivan principalmente por sus frutos, que generalmente tienen una gran diversidad de tamaño (de 500 g a 5 kg), color de la pulpa (naranja, verde y blanco), color de la cáscara (verde, amarillo, blanco, naranja y gris), forma (redonda, ovalada y alargada), y dimensiones (de 5 a 25 cm de ancho; de 10 a 50 cm de largo).

30 Mientras intentaban crear variaciones novedosas de la planta de melón, los presentes inventores trataron semillas de melón CEZ (un melón de tipo 'charentais', desarrollado por ARO) con el mutágeno químico metanosulfonato de etilo (EMS) y seleccionaron las plantas de melón 'superfructíferas' (denominadas en la presente memoria plantas "sf") que habían aumentado el número de frutos y el rendimiento (figuras 1 y 3). La inspección de los frutos de estas plantas reveló que su fruto no tenía semillas, o tenía semillas pequeñas y vacías sin desarrollar (figura 2). El análisis por HPLC de los carotenoides del fruto mutado reveló un contenido similar de betacarotenos que la contraparte isogénica sin mutar, CEZ. Además, el contenido de sólidos solubles totales (TSS, del inglés *total soluble solids*) reveló que el fruto mutado tenía un contenido de azúcar similar en comparación con la contraparte isogénica sin mutar.

35 Las plantas de tipo silvestre de 'CEZ' desarrollarán un promedio de cuatro frutos por planta y solo se desarrollará un fruto en una rama, mientras que la 'sf' es capaz de producir varios frutos en cada rama. En las plantas de tipo silvestre, la fertilización satisfactoria de una flor femenina y el inicio del desarrollo del fruto suprimirán el desarrollo de otros frutos de otras flores femeninas de la misma rama. Este mecanismo de supresión está desactivado en la 'sf'. Los cruces recíprocos hechos con la 'sf' indicaron que su polen es completamente fértil, y que el fruto se desarrollará solo después de la fertilización, aunque el pequeño fruto de la 'sf' no contendrá semillas o serán semillas pequeñas y vacías. Por lo tanto, el aborto de semillas en la 'sf' no impide el desarrollo del fruto y no inhibe la producción de muchos otros frutos en la misma rama.

40 Se demostró que este incremento de la producción único está gobernado por un solo gen recesivo (*MELO3C009603*, que codifica una proteína con dedos de zinc de tipo Cys₂His₂ (C₂H₂)) como se demostró mediante el análisis de segregación de 'sf' en cuatro poblaciones segregantes F₂ independientes.

45 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se da a conocer una planta de *C. melo* o una parte de ella, en donde la planta produce más de 12 frutos, en donde dichos frutos no tienen semillas.

50 El término "planta", tal como se usa en la presente memoria, abarca plantas enteras, ancestros y progenie de las plantas, y partes de plantas, que incluyen semillas, frutos, brotes, tallos, raíces (que incluyen tubérculos), y células, tejidos y órganos vegetales. La planta puede estar en cualquier forma, entre ellas, tejido caloso, cultivo en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, hojas, gametofitos, esporofitos, polen, óvulos y microsporas.

El término "melón", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la especie *Cucumis melo* L. que incluye las subespecies *agrestis* (vars. *conomon*, *makuwa*, *momordica* y *acidulous*) y *melo* (vars. *cantalupensis*, *reticulatus*, *adana*, *chandalok*, *ameri*, *inodorus*, *flexuosus*, *chate*, *tibish*, *dudaim* y *chito*).

El término "cultivar" se usa en la presente memoria para indicar una planta que tiene un estado biológico distinto del estado "silvestre", en la que el estado "silvestre" indica el estado original no cultivado o natural de una planta o una muestra registrada. El término "cultivar" (para la variedad cultivada) incluye, entre otros, seminatural, semisilvestre, maleza, cultivar tradicional, variedad local, material de reproducción, material de investigación, línea de reproducción, población sintética, híbrido, plantel fundador/población de base, línea endogámica (progenitor del cultivar híbrido), población segregante, acervo genético/mutante y cultivar avanzado/mejorado. Los ejemplos de cultivares incluyen las variedades cultivadas que pertenecen a los grupos taxonómicos *Cucumis melo* variedad *cantalupensis* (los tipos de fruto *Charentais* y cantalupo italiano), *Cucumis melo* variedad *reticulatis* (los tipos de fruto Galia y Ananás), y *Cucumis melo* variedad *inodorus* (entre ellos, los tipos de fruto Piel de Sapo, Amarillo Canario, Melón Blanco y Melón Verde). Por lo tanto, una planta de la presente descripción es una planta de cualquier variedad de *C. melo*. El término "var." indica una *varietas* ("variedad", un nivel taxonómico por debajo del de la especie como se detalla anteriormente).

De acuerdo con un aspecto, la planta de este aspecto de la presente descripción tiene un mayor rendimiento de frutos que las plantas de tipo silvestre del mismo acervo genético cultivadas en las mismas condiciones (es decir, dan más de 10 frutos, 12 frutos, 15 frutos, 20 frutos, 25 frutos o incluso más de 30 frutos en un momento determinado). Por lo general, el peso promedio de cada uno de los frutos es de 350 g con un margen de 100 a 600 g, en función del acervo genético (figura 4B). La planta puede comprender al menos 2, al menos 3, al menos 5 frutos por rama en un momento determinado.

La mayor parte de los frutos en la planta se encuentran en la misma etapa de maduración, en función del grado de modo climatérico/no climatérico de maduración del fruto.

Se apreciará que el peso total de frutos (es decir, la cosecha) de dicha planta es mayor que el peso total de frutos de una planta de *Cucumis melo* de tipo silvestre.

Tal como se usa en la presente memoria, la frase "planta de *Cucumis melo* de tipo silvestre" se refiere a la planta de *Cucumis melo* que tiene un genoma natural sin mutar.

Los presentes inventores han demostrado que el contenido de azúcar y el contenido de β -carotenos de los melones de la planta de este aspecto de la presente descripción son similares a los de su contraparte no mutada (de tipo silvestre). Se apreciará que las contrapartes de tipo silvestre no tienen una mutación en otros genes que afectan el contenido de β -carotenos, tal como CRTISO, como se describe en la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 20120324597. Por lo tanto, los melones de la planta de este aspecto de la presente descripción se pueden cultivar para que sean comestibles y de alta calidad en varios acervos genéticos. Son adecuados como productos frescos, como productos recién cortados o para procesamiento, tal como, por ejemplo, enlatado.

Según se mencionó, los melones de la planta de este aspecto de la presente descripción no tienen semillas.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "melón sin semillas" se refiere a un melón que no contiene semillas maduras fertilizadas. Aunque los melones de la presente descripción no contienen semillas maduras fertilizadas, los melones pueden contener ovarios no fertilizados, que son pequeños y de color blanco. Estos ovarios no fertilizados no se consideran semillas verdaderas. El contenido de semillas en el fruto se reduce en al menos un 80 % en comparación con el de un melón de tipo silvestre con los mismos acervo genético y condiciones de crecimiento.

De acuerdo con este aspecto de la presente descripción, el rasgo sin semillas está controlado por un determinante genético y es independiente del tratamiento exógeno con hormonas vegetales inductoras de la partenocarpia. Por lo tanto, el carácter sin semillas se obtiene por estenospermocarpia y no por partenocarpia.

De acuerdo con un aspecto, al menos el 80 % de los frutos de una planta determinada tienen un contenido de semillas reducido al menos en un 80 %, de al menos un 90 % a aproximadamente un 99 % o incluso en un 100 %.

De acuerdo con otro aspecto, al menos el 85 % de los frutos de una planta determinada tienen un contenido de semillas reducido al menos en un 80 %, de al menos un 90 % a aproximadamente un 99 % o incluso en un 100 %.

De acuerdo con otro aspecto, al menos el 90 % de los frutos de una planta determinada tienen un contenido de semillas reducido al menos en un 80 %, de al menos un 90 % a aproximadamente un 99 % o incluso en un 100 %.

De acuerdo con otro aspecto, al menos el 95 % de los frutos de una planta determinada tienen un contenido de semillas reducido al menos en un 80 %, de al menos un 90 % a aproximadamente un 99 % o incluso en un 100 %.

De acuerdo con otro aspecto, al menos el 99 % de los frutos de una planta determinada tienen un contenido de semillas reducido al menos en un 80 %, de al menos un 90 % a aproximadamente un 99 % o incluso en un 100 %.

Las plantas de melón de este aspecto de la presente descripción se caracterizan por tener ambos alelos del gen *MELO3C009603* (secuencia de ADNc de tipo silvestre: SEQ ID n.º 7) que tienen una mutación de pérdida de función que da como resultado un rasgo mejorado de cultivo del fruto (y opcionalmente un rasgo sin semillas). El *MELO3C009603* puede tener una sola mutación que provoque ambos rasgos, o dos mutaciones, una que conlleva el rasgo mejorado de cultivo del fruto y la otra que conlleva el rasgo sin semillas. De acuerdo con un aspecto concreto, la secuencia de aminoácidos mutada de *MELO3C009603* se presenta en la SEQ ID n.º 8.

MELO3C009603 puede estar en forma homocigota o en forma heterocigota. Según este aspecto, la homocigosis es una situación en la que ambos alelos del locus *MELO3C009603* se caracterizan por tener la misma secuencia de nucleótidos. La heterocigosis se refiere a diferentes estados del gen en el locus *MELO3C009603*.

5 El término "alelo", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquiera de una o más formas alternativas de un locus génico, en donde todos los alelos están relacionados con un rasgo o característica. En una célula u organismo diploide, los dos alelos de un gen dado ocupan los locus correspondientes en un par de cromosomas homólogos.

El término "gen", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un factor heredado que determina una característica biológica de un organismo (es decir, una planta de melón), un "alelo" es cada uno de los genes del par de genes presente en la planta de melón (diploide).

10 Una planta se denomina "homocigótica" para un gen cuando contiene los mismos alelos de dicho gen, y "heterocigótica" para un gen cuando contiene dos alelos diferentes de dicho gen. El uso de letras mayúsculas indica un gen (de tipo) dominante y el uso de letras minúsculas denota un gen recesivo: "X,X", por lo tanto, denota un genotipo homocigótico dominante para el gen o la propiedad X; "X,x" y "x,X" indican genotipos heterocigóticos; y "x,x" indica un genotipo homocigótico recesivo. Como saben los especialistas, solo el genotipo recesivo homocigoto proporcionará
15 generalmente el fenotipo recesivo correspondiente (es decir, hará que una planta muestre la propiedad o rasgo "x"), mientras que los genotipos dominantes heterocigotos y homocigotos generalmente proporcionarán el fenotipo dominante correspondiente (es decir, harán que una planta muestre la propiedad o rasgo "X"), a menos que otros genes y/o factores tales como alelos múltiples, supresores, codominancia, etc. (también) desempeñen una función en la determinación del fenotipo.

20 Una "mutación de pérdida de función" es una mutación en la secuencia de un gen, que hace que se reduzca o desaparezca por completo la función del producto del gen, generalmente una proteína. Una mutación de pérdida de función puede estar causada, por ejemplo, por el truncamiento del producto génico debido a una mutación de cambio de fase o terminadora, o por una alteración de uno o más aminoácidos. Un fenotipo asociado a un alelo con una mutación de pérdida de función suele ser recesivo, pero también puede ser dominante.

25 De acuerdo con un aspecto concreto, ambos alelos de *MELO3C009603* llevan una mutación de A a T en la posición 3,450,971 en el *scaffold* 11 del genoma del melón, lo que lleva a un cambio de aminoácido F/I en la posición 97 de la proteína de *MELO3C009603* predicha. Una secuencia polinucleotídica ejemplar de un *MELO3C009603* mutado se presenta en la SEQ ID n.º 9. Una secuencia polipeptídica ejemplar de un *MELO3C009603* mutado se presenta en la SEQ ID n.º 8.

30 Se apreciará que la presente descripción también contempla la generación del fruto de *Cucumis melo* mediante la toma de esquejes de plantas de melón 'sf' y la propagación vegetativa.

La propagación vegetativa puede efectuarse con los métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, cultivo de tejido vegetal *in vitro*, enraizamiento de brotes laterales o fusión de protoplastos. En un aspecto, un método de propagación vegetativa de una planta de la presente descripción comprende: a) recoger tejido de una planta de la presente descripción; b) cultivar dicho tejido para obtener brotes proliferantes; c) enraizar dichos brotes en proliferación para obtener plántulas enraizadas; y d) cultivar plantas a partir de dichas plántulas enraizadas.
35

Los esquejes según este aspecto de la presente descripción pueden incluir raíces, tallos, hojas, cotiledones, flores, frutos, embriones y polen. Preferiblemente, los esquejes comprenden tallos y meristemos apicales o de brotes laterales.

40 De acuerdo con un aspecto, las plantas de la presente descripción son de una variedad híbrida, es decir, se generan siguiendo el cruzamiento (es decir, el apareamiento) de dos plantas que no son isogénicas. El híbrido puede ser un híbrido de F₁ o una variedad de polinización abierta.

Un "híbrido de F₁", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la progenie de primera generación del cruce de dos plantas que no son isogénicas.

45 El desarrollo de híbridos de melón de la presente descripción requiere el desarrollo de líneas parentales estables siempre que al menos uno de ellos sea heterocigoto para el gen *sf*. En los programas de mejora genética, los rasgos deseables de dos o más fuentes de germoplasma o acervos genéticos se combinan para desarrollar variedades superiores por mejora genética. Las líneas endogámicas o parentales deseables se desarrollan mediante la autopolinización continua y la selección de las mejores líneas de reproducción, a veces utilizando marcadores moleculares para acelerar el proceso de selección.

50 Una vez que se han identificado las líneas parentales que dan el mejor rendimiento híbrido, por ejemplo, ambas portadoras de la mutación en *MELO3C009603*, la semilla híbrida se puede producir indefinidamente, siempre que se mantenga la homogeneidad de los parentales. De acuerdo con un aspecto, las plantas de melón de la presente descripción son líneas de plantas parentales estables (que portan una mutación de pérdida de función en el gen *MELO3C009603* en una forma heterocigota).

55 Tal y como se define en la presente memoria, la frase "líneas parentales estables" se refiere a líneas endogámicas de

polinización abierta, estables para las plantas deseadas durante los ciclos de autopolinización y plantación. Típicamente, el 95 % del genoma está en forma homocigota en las líneas parentales de la presente descripción.

De acuerdo con otro aspecto, la presente descripción da a conocer un método para producir plántulas de melón híbrido 'sf' de la primera generación (F₁).

5 De acuerdo con un aspecto, la presente descripción da a conocer un método para producir plántulas híbridas 'sf' de la primera generación (y también semillas) que comprende cruzar (por ejemplo, por polinización) una primera planta de melón progenitora estable que no tiene semillas y tiene un cultivo mejorado de frutos (por ejemplo, homocigoto o heterocigoto para la mutación en *MELO3C009603*) con una segunda planta de melón parental heterocigota para 'sf' estable.

10 Se apreciará que el 25 o el 50 % de las semillas de melón híbridas de F₁ son homocigotas para una mutación de *MELO3C009603*, dependiendo de si solo una o ambas líneas parentales son heterocigotas para 'sf'.

Según otro aspecto, la presente descripción también da a conocer un marcador de ADN que permite seleccionar plántulas 'sf' de F₁.

15 Así pues, de acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se da a conocer una planta de *Cucumis melo* que tiene un genoma *MELO3C009603/melo3c009603* tal que al autofecundarse el 25 % de la F₁ da más de 5 frutos, en donde dichos frutos no tienen semillas.

La presente descripción también se refiere a las semillas recogidas de estas plantas de melón híbrido de la F₁ y a las plantas cultivadas a partir de estas semillas.

20 Una práctica frecuente en la fitomejora es utilizar el método de retrocruzamiento para desarrollar nuevas variedades mediante la conversión de un único rasgo.

La frase "conversión de un único rasgo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la incorporación de un nuevo gen único en una línea parental en la que se recuperan esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas deseadas de las líneas parentales además del gen único transferido.

25 El término "retrocruzamiento", tal como se usa en la presente memoria, se refiere al cruce repetido de una progenie híbrida con una de las plantas parentales de melón. La planta de melón progenitora que aporta el gen para la característica deseada se denomina progenitor no recurrente o donante. Esta terminología se refiere al hecho de que el progenitor no recurrente se usa una vez en el protocolo de retrocruzamiento y, por lo tanto, no se repite. La planta de melón progenitora a la que se transfiere el gen del progenitor no recurrente se conoce como progenitor recurrente, ya que se utiliza durante varias rondas en el protocolo de retrocruzamiento.

30 En un protocolo típico de retrocruzamiento, una planta de las variedades originales de interés (progenitor recurrente) se cruza con una planta seleccionada de segundas variedades (progenitor no recurrente) que porta el único gen de interés que se va a transferir. La progenie resultante de este cruce se vuelve a cruzar con el progenitor recurrente y el procedimiento se repite hasta que se obtiene una planta de melón en la que esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas deseadas del progenitor recurrente se recuperan en la planta convertida, además del único gen transferido del progenitor no recurrente.

35 Por lo tanto, se pueden crear líneas casi isogénicas (NIL, del inglés *near-isogenic lines*) mediante muchos retrocruzamientos para producir una colección de individuos que son casi idénticos en la composición genética, excepto por el rasgo o región genómica en cuestión, en este caso la mutación 'sf' en *MELO3C009603*.

40 Los métodos de retrocruzamiento se pueden usar con la presente descripción para mejorar o introducir una característica en las líneas progenitoras.

45 Se puede llevar a cabo la selección asistida por marcadores de plántulas de *C. melo* que producirán más de 5 frutos sin semillas (o partes de las mismas que sean capaces de producir una planta que produzca más de 5 frutos sin semillas). Esto es especialmente ventajoso para seleccionar esquejes o durante un procedimiento de retrocruzamiento. El método comprende analizar la presencia de la mutación A/T que conduce al cambio de aminoácido F/I en la posición 97 de la proteína predicha para *MELO3C009603*, en donde la presencia de la mutación es indicativa de que la planta producirá más de 5 frutos sin semillas o que una parte de ella producirá una planta que dará más de 5 frutos sin semillas.

50 Se conocen muchos métodos en la técnica para analizar mutaciones, que incluyen, por ejemplo, extensión de una única base (SBE), secuenciación de extensión de cebador específico de alelo (ASPE), secuenciación de ADN, secuenciación de ARN, análisis de micromatrices, PCR universal, extensión específica de alelo, hibridación, espectrometría de masas, ligación, ligación y extensión, análisis mediados por la endonucleasa Flap, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), electroforesis, alineamiento de secuencias, hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) y ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).

Por lo tanto, la presente descripción contempla oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores) que pueden usarse para

distinguir entre la forma mutada y la no mutada de *MELO3C009603*. Un conjunto ejemplar de cebadores se describe en el apartado de ejemplos, SEQ ID n.ºs 3 y 4.

Los presentes inventores contemplan tanto la mutagénesis química como las técnicas recombinantes para la generación de las plantas de melón de la presente descripción.

- 5 Por tanto, las plantas de melón de la presente descripción pueden generarse al exponer la planta de melón o parte de la misma a un mutágeno químico. Los ejemplos de mutágenos químicos incluyen, entre otros, ácido nitroso, agentes alquilantes tales como metanosulfonato de etilo (EMS), metanosulfonato de metilo (MMS), sulfato de dietilo (DES) y análogos de bases nitrogenadas tal como 5-bromodesoxiuridina (5BU). Un método de ejemplo para generar las plantas de melón de la presente descripción usando la mutagénesis química incluye sumergir las semillas de melón durante
10 12 h en agua seguido de 12 h más en EMS (por ejemplo, al 1 %). Las semillas tratadas (M₁) se plantan luego y se autopolinizan para preparar las familias M₂.

- Tal como se mencionó, la planta de melón de la presente descripción también se puede generar con otras técnicas que incluyen, entre otras, (a) la eliminación del gen *MELO3C009603*; (b) inactivación transcripcional del gen *MELO3C009603*; (c) inactivación de los transcritos del gen *MELO3C009603* mediada por ARN antisentido; (d)
15 inactivación traduccional de transcritos del gen *MELO3C009603*; y (e) edición genómica del gen *MELO3C009603*.

Así pues, por ejemplo, pueden generarse y usarse construcciones de sustitución o de supresión de genes que incluyen secuencias homólogas con el gen *MELO3C009603* para insertar una secuencia auxiliar en la secuencia codificante del gen que codifica la enzima, para así inactivar este gen.

- Estas construcciones incluyen preferiblemente marcadores de selección positiva y negativa y, por lo tanto, pueden
20 emplearse para seleccionar eventos de recombinación homóloga. Un experto en la materia puede diseñar fácilmente una construcción de sustitución/supresión que incluya genes de selección tanto positiva como negativa para seleccionar con eficacia las células vegetales transformadas que sufrieron un evento de recombinación homóloga con la construcción. Estas células pueden ser cultivadas luego para convertirse en plantas completas. Pueden usarse métodos estándares conocidos en la técnica para implementar el procedimiento de sustitución/supresión. Dichos
25 métodos se presentan, por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. n.ºs 5,487,992, 5,464,764, 5,387,742, 5,360,735, 5,347,075, 5,298,422, 5,288,846, 5,221,778, 5,175,385, 5,175,384, 5,175,383, 4,736,866 así como Burke y Olson, *Methods in Enzymology*, 194:251-270, 1991; Capecchi, *Science* 244:1288-1292, 1989; Davies et al., *Nucleic Acids Research*, 20 (11) 2693-2698, 1992; Dickinson et al., *Human Molecular Genetics*, 2(8):1299-1302, 1993; Duff y Lincoln, "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expresión
30 in ES cells", *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*, 1995; Huxley et al., *Genomics*, 9:742-750, 1991; Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-261, 1993; Lamb et al., *Nature Genetics*, 5: 22-29, 1993; Pearson y Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90:10578-82; Rothstein, *Methods in Enzymology*, 194:281-301, 1991; Schedl et al., *Nature*, 362: 258-261, 1993; Strauss et al., *Science*, 259:1904-1907, 1993, solicitudes de patente internacional WO 94/23049, WO 93/14200, WO 94/06908 y WO 94/28123, también dan a conocer información.

- 35 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto concreto de la presente descripción, la planta de melón se genera mediante la introducción en ella de una construcción de ácido nucleico, en donde la construcción de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente polinucleotídico que regula al alza la expresión del *MELO3C009603* que tiene una mutación productora de un rasgo de mejor rendimiento de cultivo (y opcionalmente un rasgo sin semillas) y un elemento regulador que actúa en *cis* capaz de dirigir la expresión del agente polinucleotídico
40 en la planta.

- Las construcciones útiles en los métodos de acuerdo con la presente descripción pueden construirse con tecnología de ADN recombinante bien conocida por los expertos en la técnica. Las construcciones génicas pueden insertarse en vectores, que pueden estar disponibles en el mercado, adecuados para la transformación en plantas y adecuados para la expresión del gen de interés en las células transformadas. La construcción genética puede ser un vector de
45 expresión en el que la secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una o más secuencias reguladoras que permiten la expresión en las células vegetales.

- El polinucleótido de acuerdo con este aspecto de la presente descripción puede codificar el *MELO3C009603* que tiene, por ejemplo, una mutación F/I en la posición 97. La secuencia polipeptídica de un ejemplo de *MELO3C009603* que tiene una mutación F/I en la posición 97 es típicamente homóloga en al menos un 90 %, al menos un 91 % homóloga,
50 al menos un 92 % homóloga, al menos un 93 % homóloga, al menos un 94 % homóloga, al menos un 95 % homóloga, al menos un 96 % homóloga, al menos un 97 % homóloga, al menos un 98 % homóloga, al menos un 99 % homóloga, o un 100 % homóloga a la secuencia presentada en la SEQ ID n.º 8. La secuencia de ácido nucleico de un polinucleótido ejemplar que codifica dicha proteína puede ser al menos un 90 % homóloga, al menos un 91 % homóloga, al menos un 92 % homóloga, al menos un 93 % homóloga, al menos un 94 % homóloga, al menos un 95 % homóloga, al menos un 96 % homóloga, al menos un 97 % homóloga, al menos un 98 % homóloga, al menos un 99 % homóloga, o un 100 % homóloga a la secuencia de ácido nucleico presentada en la SEQ ID n.º 9.
55

En un aspecto particular de la presente descripción, la secuencia reguladora es un promotor expresable en las plantas.

Tal y como se usa en la presente memoria, la frase "expresable en las plantas" se refiere a una secuencia promotora,

incluidos los elementos reguladores adicionales agregados o contenidos en ella, que es al menos capaz de inducir, conferir, activar o mejorar la expresión en una célula, tejido u órgano de melón.

El promotor puede ser un promotor regulable, un promotor constitutivo o un promotor asociado a tejido.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "promotor regulable" se refiere a cualquier promotor cuya actividad se ve afectada por condiciones ambientales o de desarrollo específicas.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "promotor constitutivo" se refiere a cualquier promotor que dirige la producción de ARN en muchos o todos los tejidos de una planta transformante en la mayoría de los casos.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "promotor asociado a tejido" se refiere a cualquier promotor que dirija la síntesis de ARN a niveles más altos en determinados tipos de células y tejidos (p. ej., un promotor asociado a frutos).

Los ejemplos de promotores que se pueden usar para expresar una secuencia de ácido nucleico unida operativamente (es decir, un transgén) incluyen el promotor del virus del mosaico de la coliflor, CaMV, y el promotor del virus del mosaico del tabaco, TMV.

15 Otros promotores que se pueden usar en el contexto de la presente descripción incluyen los descritos en la patente de los EE. UU. n.º 20060168699 y por Hector G. Numez-Palenius et al. [*Critical Reviews in Biotechnology*, volumen 28, número 1 de marzo de 2008, páginas 13-55].

20 Las células vegetales pueden transformarse de manera estable o transitoria con las construcciones de ácido nucleico de la presente descripción. En la transformación estable, la molécula de ácido nucleico de la presente descripción se integra en el genoma de la planta y, como tal, representa un rasgo heredado y estable. En la transformación transitoria, la célula transformada expresa la molécula de ácido nucleico, pero no está integrada en el genoma y, como tal, representa un rasgo transitorio.

Existen varios métodos para introducir genes exógenos en las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Potrykus, I., *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* (1991) 42:205-225; Shimamoto et al., *Nature* (1989) 338: 274-276).

25 Los principales métodos para provocar la integración estable del ADN exógeno en el ADN genómico de la planta incluyen dos estrategias principales:

(i) Transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*: Klee et al. (1987) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:467-486; Klee y Rogers en *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J. y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, California (1989), pág. 2-25; Gatenby, en *Plant Biotechnology*, eds. Kung, S. y Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) pág. 93-112.

30 (ii) captación directa de ADN: Paszkowski et al., en *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes eds. Schell, J. y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, California (1989), pág. 52-68; incluye los métodos para la captación directa de ADN en protoplastos, Toriyama, K. et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1072-1074. Captación de ADN inducida por una breve descarga eléctrica en las células vegetales: Zhang et al. *Plant Cell Rep* (1988) 7: 379-384. Fromm et al. *Nature* (1986) 319: 791-793. inyección de ADN en las células o tejidos vegetales mediante bombardeo de partículas, Klein et al. *Bio/Technology* (1988) 6: 559-563; McCabe et al. *Bio/Technology* (1988) 6: 923-926; Sanford, *Physiol. Plant.* (1990) 79:206-209; mediante el uso de sistemas de micropipetas: Neuhaus y col., *Theor. Appl. Genet.* (1987) 75:30-36; Neuhaus y Spangenberg, *Physiol. Plant.* (1990) 79:213-217; transformación mediante fibra de vidrio o fibra de carburo de silicio de cultivos celulares, embriones o tejido calloso, patente de los EE. UU. n.º 5,464,765 o por la incubación directa de ADN con polen en germinación, De Wet et al. en *Experimental Manipulation of Ovule Tissue*, eds. Chapman, G. P. y Mantell, S. H. y Daniels, W. Longman, Londres, (1985) pág. 197-209; y Ohta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83:715-719.

45 El sistema de *Agrobacterium* incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos de ADN definidos que se integran en el ADN genómico de la planta. Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían según la especie de planta y el sistema de administración de *Agrobacterium*. Una estrategia ampliamente utilizada es el procedimiento de disco de hoja que se puede realizar con cualquier explante de tejido que proporcione una buena fuente para el inicio de la diferenciación de toda la planta. Horsch et al. en *Plant Molecular Biology Manual A5*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) p. 1-9. Una estrategia complementaria emplea el sistema de administración con *Agrobacterium* en combinación con la infiltración al vacío. El sistema de *Agrobacterium* es especialmente viable para la creación de plantas dicotiledóneas transgénicas.

50 Existen varios métodos de transferencia directa de ADN a las células vegetales. En la electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un campo eléctrico fuerte. En la microinyección, el ADN se inyecta por medios mecánicos directamente en las células con el uso de micropipetas muy pequeñas. En el bombardeo de micropartículas, el ADN se adsorbe en microproyectiles, tales como cristales de sulfato de magnesio o partículas de tungsteno, y los microproyectiles se aceleran físicamente hacia las células o los tejidos vegetales.

Después de la transformación estable, se hace la propagación de la planta. El método más frecuente de propagación de plantas es por semillas. La regeneración por propagación de semillas, sin embargo, tiene la deficiencia de que, debido a la heterocigosis, existe una falta de uniformidad en el cultivo, ya que las semillas son producidas por las plantas de acuerdo con las variaciones genéticas regidas por las reglas mendelianas. Básicamente, cada semilla es genéticamente diferente y cada una crecerá con sus propios rasgos específicos. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada se produzca de manera que la planta regenerada tenga los mismos rasgos y características que la planta transgénica original. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada se regenere por micropropagación, lo que proporciona una reproducción rápida y constante de las plantas transformadas.

La micropropagación es un procedimiento de cultivo de plantas de nueva generación a partir de una sola pieza de tejido que ha sido extirpada de una planta o cultivar original seleccionados. Este procedimiento permite la reproducción masiva de plantas que tienen el tejido preferido expresando la proteína de fusión. Las plantas de nueva generación que se producen son genéticamente idénticas y tienen todas las características de la planta original. La micropropagación permite la producción masiva de material vegetal de calidad en un corto período de tiempo y ofrece una rápida multiplicación de cultivares seleccionados para la preservación de las características de la planta transgénica original o transformada. Las ventajas de la clonación de plantas son la velocidad de multiplicación de las plantas, y la calidad y uniformidad de las plantas producidas.

La micropropagación es un procedimiento de múltiples etapas que requiere la alteración del medio de cultivo o las condiciones de crecimiento entre las etapas. Así, el procedimiento de micropropagación implica cuatro etapas básicas: etapa uno, cultivo inicial de tejidos; etapa dos, multiplicación del cultivo de tejidos; etapa tres, diferenciación y formación de plantas; y etapa cuatro, cultivo y fortalecimiento en el invernadero. Durante la etapa uno, con el cultivo inicial de tejidos se consolida el cultivo de tejidos y se certifica libre de contaminantes. Durante la etapa dos, el cultivo de tejidos inicial se multiplica hasta que se produce una cantidad suficiente de muestras de tejido para cumplir con los objetivos de producción. Durante la etapa tres, se dividen las muestras de tejido cultivadas en la etapa dos y se hacen crecer como plántulas independientes. En la etapa cuatro, las plántulas transformadas se transfieren a un invernadero para su fortalecimiento, en donde la tolerancia de las plantas a la luz se aumenta gradualmente para que puedan crecer en el entorno natural.

Aunque actualmente se prefiere la transformación estable, la presente descripción también contempla la transformación transitoria de células de hojas, de células meristemáticas o de la planta entera.

La transformación transitoria puede efectuarse mediante cualquiera de los métodos de transferencia directa de ADN descritos anteriormente o mediante la infección vírica mediante virus vegetales modificados.

Los virus que han demostrado ser útiles para la transformación de hospedadores vegetales incluyen CaMV, TMV y BV. La transformación de las plantas usando virus de plantas se describe en la patente de los EE. UU. n.º 4,855,237 (BGV), EP-A 67,553 (TMV), solicitud de patente japonesa publicada con n.º 63-14693 (TMV), EPA 194,809 (BV), EPA 278,667 (BV); y Gluzman, Y. et al., *Communications in Molecular Biology: Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, págs. 172-189 (1988). Las partículas de pseudovirus para su uso en la expresión de ADN exógeno en muchos hospedadores, incluidas las plantas, se describen en la solicitud de patente internacional WO 87/06261.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero no se limita a".

El término "que consiste en" significa "que incluye y se limita a".

El término "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir otros ingredientes, pasos y/o partes, pero solo si los ingredientes, pasos y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicados.

Tal y como se usa en la presente memoria, la forma singular "un", "una", "la" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir numerosos compuestos, incluidas sus mezclas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "método" se refiere a formas, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada, incluidos, entre otros, los modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de formas, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Se aprecia que ciertas características de la descripción, que se describen, para mayor claridad, en el contexto de aspectos independientes, también se pueden dar a conocer en combinación en un solo aspecto. Por el contrario, varias características de la descripción, que son, por brevedad, descritas en el contexto de un solo aspecto, también pueden darse a conocer por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como adecuado en cualquier otro aspecto descrito de la descripción. Ciertas características descritas en el contexto de varios aspectos no deben

considerarse características esenciales de esos aspectos, a menos que el aspecto no funcione sin esos elementos.

Diversos aspectos y los aspectos de la presente descripción, tal como se delineó anteriormente en la presente memoria y como se reivindica en el apartado de reivindicaciones que viene a continuación, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

5 Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunos aspectos de la descripción de manera no limitativa.

Generalmente, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente descripción incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*" Sambrook et al., (1989); "*Current Protocols in Molecular Biology*", volúmenes I-III, Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "*Current Protocols in Molecular Biology*", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "*A Practical Guide to Molecular Cloning*", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "*Recombinant DNA*", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "*Genome Analysis: A Laboratory Manual Series*", vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías presentadas en las patentes de los EE. UU. n.ºs 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057; "*Cell Biology: A Laboratory Handbook*", volúmenes I-III, Cellis, J. E., ed. (1994); "*Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique*" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), tercera edición; "*Current Protocols in Immunology*", volúmenes I-III, Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "*Basic and Clinical Immunology*" (8.ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "*Selected Methods in Cellular Immunology*", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen con detalle en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. n.ºs 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 y 5,281,521; "*Oligonucleotide Synthesis*" Gait, M. J., ed. (1984); "*Nucleic Acid Hybridization*" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "*Transcription and Translation*", Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1984); "*Animal Cell Culture*", Freshney, Rhode Island, ed. (1986); "*Immobilized Cells and Enzymes*", IRL Press, (1986); "*A Practical Guide to Molecular Cloning*", Perbal, B., (1984) y "*Methods in Enzymology*", vol. 1-317, Academic Press; "*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "*Strategies for Protein Purification and Characterization – A Laboratory Course Manual*", CSHL Press (1996). A lo largo de este documento se dan a conocer otras referencias generales. Se cree que los procedimientos allí descritos son bien conocidos en la técnica y se dan a conocer para comodidad del lector.

Materiales y métodos

Material vegetal

Semillas de 'CEZ', un melón de tipo 'Charentais' (*Cucumis melo* subesp. *melo* grupo *Cantalupensis*), se sometieron a mutagénesis con EMS, las plantas M₁ se autopolinizaron, las familias M₂ se fenotiparon visualmente y los linajes mutantes se seleccionaron como se describió anteriormente (Tadmor et al., 2007). Las plantas se cultivaron en las condiciones convencionales en el campo y en el invernadero.

Análisis de los carotenoides de los frutos

Se recogieron 5 frutos maduros, se pelaron, se rebanaron, y se les cortó una rebanada central en cubos pequeños y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras de los frutos congelados se molieron hasta obtener un polvo fino mediante un molino analítico A11 (Ika) en presencia de nitrógeno líquido. Los carotenoides se extrajeron de 0,5 g de tejido triturado en una mezcla de hexano:acetona:etanol (50:25:25, v/v/v) como se describe en Tadmor et al., (2005) y se analizaron, se identificaron y se cuantificaron con un aparato 2695 de HPLC de Waters (Milford, MA) equipado con un detector PDA 996 de Waters y el programa informático Millennium (Waters), como se ha descrito previamente (Tadmor et al., 2000).

Extracción de ARN

La extracción del ARN para el análisis por ARN-Seq se realizó de acuerdo con Portnoy et al 2011, como se describe a continuación. La extracción de ARN adicional para RT-PCR utilizó el mismo protocolo, reducido en 1/20, comenzando con aproximadamente 100 mg de tejido congelado en tubos de 1,5 ml.

Se pulverizaron a mano tejidos de la cáscara de frutos congelados (alrededor de 5 g de cáscara de frutos de 1,5 mm de grosor) con un mortero en nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se mezcló bien por agitación vorticial en un tubo de 50 ml con 10 ml de tampón de extracción que contenía Tris-HCl a 0,2 M (pH 9,0), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 0,2 M, NaCl a 0,4 M y SDS al 2 % (p/v), y se incubó a 65 °C durante 5 min. Luego se le añadió lauroilsarcosina sódica al 30 % (p/v) hasta una concentración final del 2 % (v/v), y la mezcla se agitó vorticialmente y se incubó a 65 °C durante 2 a 3 min. Se le añadió un volumen igual de fenol a la solución, se agitó vorticialmente y se centrifugó a 5000g durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 50 ml en hielo, después de tres rondas de extracciones con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v). Los ácidos nucleicos se precipitaron con 1/10 de volumen

de acetato de sodio a 3 M (NaAc) (pH 5,3) y 2 volúmenes de EtOH al 95 % (v/v). El sedimento de ácido nucleico resultante se disolvió en 10 ml de LiCl a 2 M a 4 °C durante una noche. El ARN total se precipitó por centrifugación a 15 000g durante 10 min a 4 °C y se disolvió en 0,5 ml de agua con dietilpircarbonato (DEPC). Después de volver a precipitar con 1/10 de volumen de NaAc a 3 M (pH 5,3) y 2 volúmenes de EtOH al 95 %, el sedimento se disolvió en 50 a 100 µl de agua DEPC. El ARN se trató adicionalmente con ADNasa I (Thermo Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de la reacción con ADNasa, las muestras se limpiaron mediante extracción con cloroformo-alcohol isoamílico, se precipitaron con 1/10 de volumen de NaAc a 3 M y 2 volúmenes de EtOH al 95 %, se lavaron con EtOH al 70 %, se secaron al aire durante 5 min y se diluyeron en agua. La calidad del ARN se analizó con un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), electroforesis en gel de agarosa SB al 1 % y PCR con cebadores flanqueantes de intrones para verificar en el gel de agarosa si se observa la presencia de contaminación de ADN.

El ARN de las hojas se extrajo con triReagent (Sigma), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se aplicó ADNasa I (Thermo Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se lavó mediante la adición de cloroformo-alcohol isoamílico, se precipitó con isopropanol, se lavó con EtOH al 70 %, se dejó secar al aire durante 5 min y se disolvió en ddH₂O. La concentración de ARN se determinó mediante NanoDrop.

ARN-Seq

Después del tratamiento con ADNasa, se comprobó la integridad de las muestras de ARN en un gel de agarosa al 1 %, se comprobó la pureza en el NanoDrop (proporción 260/280 de aproximadamente 2, 260/230 de aproximadamente 2,4), y se determinó la ausencia de contaminación del ADN mediante un análisis por PCR con los cebadores de intrones de EF1α.

F: AGGCTGATTGTGCTGCTCCTT - SEQ ID n.º 1;

R: GATGGGAACGAAGGGAATTT - SEQ ID n.º 2.

Las muestras que contienen ADN contaminado deben producir amplicones de 391 pb, en lugar de un ADNc de 303 pb, cuando se fraccionan en un gel de agarosa. Las muestras que contenían aproximadamente 30 µg de ARN se precipitaron con dos volúmenes de EtOH y 1/10 de volumen de NaAc a 3 M y se almacenaron a (-20 °C). La construcción de bibliotecas específicas de cadena se realizó con TruSeq RNA Samp Prep Kit FC-121-1031 (Illumina Inc) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se enviaron doce genotecas en hielo seco para la secuenciación con Illumina HiSeq2000. Cada genoteca se tipificó individualmente y todas las genotecas se secuenciaron en un carril de Illumina con un rendimiento promedio de 17×10^6 lecturas de 50 pb por genoteca. Las lecturas de Illumina se clasificaron en función de la genoteca y se retiraron los códigos de barras tipificadores. A las lecturas sin procesar se les recortaron las bases de baja calidad al final de la ARN-seq y las lecturas de baja calidad se retiraron con el kit de herramientas FASTX. Luego, las lecturas de alta calidad resultantes se mapearon sobre el genoma del melón con TopHat versión v2.0.10 (Kim et al., 2011) y se contaron con HTseq v0.5.3p3. Se utilizó el paquete DESeq (Anders, 2010) de Bioconductor en el entorno R para identificar los genes expresados diferencialmente entre las muestras 'sf' y 'de tipo silvestre'. Los genes con FDR < 0,05 se consideró que presentaban expresión diferencial. El análisis de SNP se llevó a cabo con las rutinas de detección de variantes del programa GATK Unified Genotyper (versión 2.5-2) (DePristo et al., 2011) y se filtró para lograr un conjunto de SNP de alta confianza.

RT-PCR

Se usó 1 µg de ARN para la síntesis de ADNc usando el 'sistema Verso' (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción se realizó en un sistema Eco RT-PCR (Illumina). Cada muestra contenía: 1 µl de ADNc, 0,2 µl de cada cebador (10 mM), 5 µl de la mezcla de reacción de la mezcla madre del FastSYBR green (Applied Biosystems) y 3,6 µl de ddH₂O. La máquina se programó según lo especificado por el fabricante de la enzima. Cada análisis se realizó en relación con el gen de mantenimiento ARP1 y se analizó en el programa Eco versión 4.

Extracción del ADN

Los meristemos de plantas jóvenes (aproximadamente 1 g) se molieron en nitrógeno líquido a mano con un mortero. La solución de extracción del ADN se preparó mezclando el tampón de extracción (sorbitol a 0,35 M, Tris a 0,1 M, EDTA a 5 mM, pH 7, se le añade bisulfito de sodio a 0,02 M antes de usar) : el tampón de lisis nucleica (sorbitol a 0,35 M, Tris a 0,1 M, EDTA a 5 mM, pH 7, se le añade CTAB al 2 % antes de usar) : sarcosilo al 5 %, en una relación de 1:1:0,4. Todos los productos químicos fueron suministrados por Sigma. La solución de extracción del ADN se incubó a 65 °C. Se le añadieron 600 µl de la solución de extracción del ADN a 100 µg de tejido pesado en un tubo de 1,5 ml, se mezcló y se incubó a 65 °C durante 10 min. Se le añadieron 600 µl de cloroformo:isoamilalcohol (relación de 24:1), se mezclaron durante 5 min a 200 rpm, se centrifugaron a 15 000g durante 10 min y se extrajo el sobrenadante a un tubo nuevo. Se le añadió isopropanol frío (2/3 del volumen de sobrenadante), se mezcló, se incubó durante 30 min durante toda la noche (-20 °C), se centrifugó a 20 000g durante 10 min, se retiró la fase líquida, se lavó el sedimento con EtOH al 70 %, se precipitó nuevamente y se retiró el EtOH, el sedimento se secó al aire durante 5 min, se disolvió con 50-200 µl de agua, se le agregaron 2 µl de ARNasa, las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 min, se centrifugaron a 15 000g durante 3 min y se retiró el sobrenadante a un tubo nuevo. La concentración y la pureza del ADN se determinaron en el NanoDrop, la integridad del ADN se comprobó en un gel de agarosa al 0,8 %.

Resultados

Identificación de la superfructífera

Se realizó el fenotipado visual de 2 000 familias M₂ derivadas de semillas mutagenizadas de la línea para mejora 'CEZ'. Cada familia M₂ estaba representada en el campo por 12 plantas. Una familia se segregó por un fenotipo único; 3 de las 12 plantas cultivadas en el campo produjeron más de 15 frutos por planta (figuras 1 y 2) en comparación con las plantas de tipo silvestre que produjeron un promedio de 3 frutos. Cada una de los frutos de los mutantes pesaba aproximadamente 300 g, mientras que el fruto de tipo silvestre pesaba aproximadamente 900 g. Curiosamente, el fruto del mutante no tenía semillas o tenía las semillas vacías y muy pequeñas. Esta mutación se denomina en la presente memoria "superfructífera" (figura 3). Cuando se diluyó el fruto de una planta 'sf', el fruto permaneció pequeño.

Herencia del carácter superfructífero

Los esquejes de las plantas superfructíferas ('sf') se transfirieron al invernadero una vez que desarrollaron suficientes raíces. Las plantas 'sf' desarrolladas a partir de los esquejes no podían autopolinizarse. Sin embargo, su polen se usó para la polinización exitosa de las líneas 'CEZ', 'Noy Yizre'el', 'Ein Dor' y 'Piel De Sapo', y se obtuvieron semillas viables de la F₁. Estas semillas se sembraron y las plantas F₁ se autopolinizaron con éxito para producir semillas F₂. Se plantaron en el campo 150-200 plantas de cada una de las poblaciones de la F₂, se dejaron crecer en las condiciones de producción comercial y las abejas las polinizaron al aire libre. Una vez que se generó el fruto, los presentes inventores pudieron distinguir visualmente entre fenotipos 'sf' y de tipo silvestre. En las cuatro poblaciones F₂, 'sf' se segregó como un único gen recesivo (tabla 1).

Tabla 1

Población F ₂	n	Fenotipo	Observado	Esperado	χ^2	P
ED × sf	188	sf	43	47	0,454	0,5005
		silvestre	145	141		
NY × sf	166	sf	39	41,5	0,201	0,6541
		silvestre	127	124,5		
CEZ × sf	191	sf	48	47,75	0,002	0,9667
		silvestre	143	143,25		
PDS × sf	194	sf	38	48,5	3,031	0,0817
		silvestre	156	145,5		

Valor de χ^2 de la desviación de los segregantes de la relación mendeliana esperada de 1:3. 'n': tamaño de la población; un valor de P mayor que 0,05 indica que existe una alta probabilidad de que las desviaciones observadas se deban únicamente al azar.

Para estimar el rendimiento de 'sf', los presentes inventores midieron el número de frutos y el peso de todas las plantas 'sf', dividieron la suma de los frutos por el número de plantas para obtener un número medio de frutos por planta, dividieron la suma del peso de los frutos por el número de plantas para obtener un rendimiento medio por planta y dividieron la suma del peso de frutos por el número de frutos para obtener un peso medio de frutos. Se realizaron mediciones y cálculos similares para las plantas de tipo silvestre. En todos los acervos genéticos probados, los 'sf' llevaban significativamente más frutos (figura 4A), frutos significativamente más pequeños (figura 4B) y un rendimiento por planta significativamente mayor (figura 4C).

Para determinar el efecto de 'sf' sobre la calidad del fruto, los presentes inventores escogieron aleatoriamente 10 frutos maduros de CEZ y de CEZ × 'sf' de tipo silvestre y segregantes del fenotipo 'sf'. Se degustaron los frutos, se analizaron los sólidos solubles totales (TSS, del inglés *total soluble solids*) como un índice del contenido de azúcares, y se analizó por HPLC el contenido de β -carotenos. No se detectó ningún efecto de 'sf' sobre el sabor del fruto del melón, que está determinado principalmente por el contenido de azúcares. No se detectaron diferencias de calidad entre las 'sf', los segregantes de tipo silvestre o los 'CEZ', incluido el contenido de TSS o β -carotenos (figuras 5A-B).

Para identificar el gen que determina el fenotipo 'sf', se seleccionaron dos réplicas de 10 plantas que muestran el fenotipo 'sf' o de tipo silvestre en las poblaciones F₂ segregantes de 'sf' × NY y 'sf' × ED, el fenotipo 'sf' de la población F₂ segregante de 'sf' × CEZ y la línea originaria de 'sf', CEZ. De cada una de estas plantas se tomaron muestras de los meristemas apicales, tallos, flores femeninas y frutos jóvenes a la edad de 2-4 días después de la polinización. El ARN se extrajo de las masas de cada combinación de tejido × fenotipo. Se combinaron cantidades iguales de ARN de todos los tejidos para desarrollar dos réplicas de los fenotipos 'sf' y de tipo silvestre de las poblaciones F₂ (8 grupos) segregantes de 'sf' × NY y de 'sf' × ED, del fenotipo 'sf' de la población F₂ segregante de 'sf' × CEZ y la línea originaria de 'sf', CEZ (cuatro grupos). Se analizaron por ARN-Seq 12 genotecas con Illumina HiSeq 2000, lo que arrojó un promedio de 17×10^6 lecturas para cada genoteca. Los polimorfismos mononucleotídicos (SNP) identificados mediante la comparación de los datos de ARN-Seq de los grupos fenotípicos, derivados de poblaciones F₂ segregantes de 'sf' × NY y de 'sf' × ED, estaban dispersos por el genoma del melón, aunque la mayoría de ellos estaban ubicados

en el *scaffold* 11. Los presentes inventores buscaron entonces los SNP que eran homocigotos en 'CEZ', llevaron el alelo alternativo en todos los fenotipos 'sf' y llevaron principalmente el alelo 'CEZ' en todos los fenotipos de tipo silvestre. Un solo SNP en *MELO3C009603* que está ubicado en el *scaffold* 11 del cromosoma 4 se fijó en todo el material de 'sf' ('A') en comparación con 'CEZ' ('T') y era el alelo menor en todos los fenotipos de 'tipo silvestre'.

- 5 Se diseñaron cebadores para que la PCR amplifique un fragmento de 213 pb que tiene un sitio de restricción de *ApoI* en el alelo de tipo silvestre que está mutado en sf.

F TAGACATGAGCCGCATCTGA - SEQ ID n.º 3

R GAACGTGGCAACAACAACAA - SEC ID n.º 4

- 10 Cuando se digiere con *ApoI* el fragmento amplificado por PCR, se producen fragmentos de 140 pb y 73 pb en el tipo silvestre, un fragmento de 213 pb cuando se digiere un mutante homocigoto para 'sf', y las tres bandas en el heterocigoto (figura 6B). Este marcador mostró una cosegregación completa con el fenotipo 'sf' en cuatro poblaciones F₂ independientes compuestas por al menos 300 plantas cada una.

- 15 *MELO3C009603* codifica una proteína con dedo de zinc (ZF) de tipo Cys₂ His₂. La transversión de 'T' a 'A' hizo cambiar de TTC, que codifica el aminoácido altamente conservado fenilalanina de la posición 97 (F⁹⁷), a ATC, que codifica la isoleucina (I) en el motivo ZF (figura 7).

Los datos de ARN-Seq indicaron que la expresión digital de *MELO3C009603* es baja, solo 40-60 lecturas en cada masa y similar en ambas masas. Estas masas incluían una mezcla de varios tejidos. Se analizó la expresión relativa de *MELO3C009603* en cada uno de estos tejidos usando la RT-PCR cuantitativa y se encontró que tiene la misma expresión baja en las hojas y una expresión muy baja similar en todos los demás tejidos analizados (figuras 8A-B).

- 20 El análisis de los datos de ARN-Seq para los genes expresados diferencialmente (DEG, del inglés *differentially expressed genes*) identificó 103 genes que mostraban un cambio de más del doble entre 'CEZ' y 'sf', la comparación isógena. Solo 55 genes, de estos 103, mostraron una diferencia significativa, mientras que al usar el valor de *P* ajustado de estos 55, solo 14 genes mostraban una expresión diferencial significativa entre las masas de 'sf' y de 'tipo silvestre' en las tres poblaciones segregantes analizadas (figura 9 y tabla 2, que vienen a continuación en la presente memoria). De estos 14 genes, solo *MELO3C021150*, que codifica un homólogo de la proteína específica de la nucela de semillas, descendió en las 'sf' de las tres poblaciones analizadas y *MELO3C003230*, que codifica un posible homólogo de antocianina 5-ariloaciltransferasa, se indujo en las 'sf' de las poblaciones analizadas. Los otros doce genes muestran una dirección de cambio similar en 'CEZ × sf' y en 'ED × sf', pero en dirección opuesta en la población F₂ de 'NY × sf' (tabla 2, en la presente memoria a continuación). El análisis cuantitativo por RT-PCR de
- 25 *MELO3C021150* en diferentes órganos indicó que la expresión digital encontrada entre las masas es aportada por el
- 30 tejido del fruto joven y que *MELO3C021150* no se transcribe en ninguno de los otros tejidos (figura 10).

Tabla 2

C sub-c	ID	CEZ sf	CEZ WT	Wt/sf P	P ajustada	ED sf	ED WT	WT/sf P	P ajustada	NY sf	NY WT	WT/sf P	P ajustada	ACC	DESC				
1	AAA	MELO3C021150	2,5	139,5	56,5	0,0000	0,0000	1,9	20,4	10,6	0,0001	0,0130	1,1	36,8	32,2	0,0000	0,0000	AAB82329	proteína específica de la nucela de semilla [<i>Citrullus lanatus</i>]
1	AAA	MELO3C003230	953,6	331,1	0,3	0,0000	0,0009	953,6	253,4	0,4	0,0000	0,0003	1 277,1	346,0	0,3	0,0000	0,0002	XP_002531355	Antocianina 5-ariloaciltransferasa, putativa [<i>Ricinus communis</i>]
2	AA	MELO3C022716	3,9	247,2	63,4	0,0000	0,0000	1,4	7,8	5,6	0,0486	1,0000	5,2	46,9	9,0	0,0000	0,0003	AAB82329	proteína específica de la nucela de semilla [<i>Citrullus lanatus</i>]
2	AA	MELO3C023027	2 064,6	401,0	0,2	0,0000	0,0000	2 064,6	668,2	0,5	0,0001	0,0239	821,0	437,8	0,5	0,0152	0,4081	AAM74923	lectina de floema Lec17-1 de 17 kDa [<i>Cucumis melo</i>]
2	AA	MELO3C015490	170,1	35,7	0,2	0,0000	0,0000	170,1	59,1	0,6	0,0486	1,0000	256,8	80,2	0,3	0,0001	0,0059	XP_002514129	proteína de unión a calmodulina, putativa [<i>Ricinus communis</i>]
2	AA	MELO3C027040	1176,0	352,7	0,3	0,0000	0,0001	1176,0	363,7	0,3	0,0000	0,0000	559,6	333,6	0,6	0,0500	0,8348	AAM74923	lectina de floema Lec17-1 de 17 kDa [<i>Cucumis melo</i>]
2	AA	MELO3C024762	365,0	111,0	0,3	0,0000	0,0004	365,0	70,4	0,3	0,0000	0,0010	176,8	80,6	0,5	0,0064	0,2300	AAW51125	alcohol aciltransferasas, putativas [<i>Cucumis melo</i>]
2	AA	MELO3C007337	54,3	10,5	0,2	0,0000	0,0017	543	25,7	0,5	0,0187	0,7167	132,5	45,1	0,3	0,0006	0,0374	ADL36665	Factor de transcripción de la clase con el dominio COL [<i>Malus × domestica</i>]
2	AA	MELO3C006043	468,3	167,9	0,4	0,0000	0,0024	468,3	235,6	0,6	0,0062	0,3771	695,8	250,4	0,4	0,0002	0,0140	ADN34176	UDP-glucosa:glucosiltransferasa [<i>Cucumis melo</i> subsp. <i>meló</i>]
2	AA	MELO3C026488	468,8	198,2	0,4	0,0004	0,0201	468,8	113,2	0,4	0,0002	0,0299	401,8	191,0	0,5	0,0068	0,2404	O49858	Nombre: completo =Citocromo P450 82A3; Nombre alternativo: Completo = Citocromo P450 GP6
2	A	MELO3C002560	452,8	66,6	0,1	0,0000	0,0000	452,8	59,1	0,6	0,0372	1,0000	151,3	92,8	0,6	0,0966	1,0000	AAV85179	proteína expresada en fibra [<i>Gossypium hirsutum</i>]
2	A	MELO3C007961	17,9	127,3	7,1	0,0000	0,0000	17,9	36,7	3,3	0,0010	0,1077	9,9	161	1,6	0,3521	1,0000	BAB40817	endoquitinasa MCHT-2 [<i>Cucumis melo</i>]
2	A	MELO3C008466	167,9	32,1	0,2	0,0000	0,0000	167,9	9,9	0,4	0,0304	0,9321	42,3	18,7	0,4	0,0363	0,6980	XP_002520298	proteína de unión al calcio/moide, putativa [<i>Ricinus communis</i>]
2	A	MELO3C013917	206,2	53,5	0,3	0,0000	0,0001	206,2	56,2	0,6	0,0296	0,9195	248,0	102,3	0,4	0,0021	0,0950	ADE41101	Factor de transcripción de la clase con el dominio AP2 [<i>Malus × domestica</i>]
2	A	MELO3C023255	66,5	13,8	0,2	0,0000	0,0008	66,5	43,3	0,6	0,0665	1,0000	66,7	329	0,5	0,0358	0,6926	XP_002328473	proteína predicha [<i>Populus trichocarpa</i>]
2	A	MELO3C005711	353,7	125,2	0,4	0,0000	0,0031	353,7	181,9	0,5	0,0017	0,1555	606,4	293,8	0,5	0,0075	0,2576	XP_002509857	proteína de unión a iones

2	A	MELO3C011268	8,5	38,2	4,5	0,0003	0,0176	8,5	43,2	1,9	0,0380	1,0000	5,1	19,5	3,8	0,0173	0,4476	XP_002515504	metálicos, putativa [Ricinus communis]
2	A	MELO3C021821	198,7	77,7	0,4	0,0004	0,0233	198,7	187,6	1,7	0,0236	0,8141	257,9	127,4	0,5	0,0127	0,3633	XP_002328950	Proteína de unión a ATP, putativa [Ricinus communis]
2	A	MELO3C026807	102,0	37,3	0,4	0,0007	0,0331	102,0	30,1	0,5	0,0412	1,0000	2,2	1,3	0,6	0,8120	1,0000		glicosiltransferasa, familia CAZy GT2 [Populus trichocarpa]
1	BBB	MELO3C003917	924,3	422	0,0	0,0000	0,0000	924,3	14,1	0,0	0,0000	0,0000	60,4	3450,8	57,1	0,0000	0,0000	ACC93947	proteína de choque térmico 70 [Hevea brasiliensis]
1	BBB	MELO3C027124	853,0	41,8	0,0	0,0000	0,0000	853,0	9,5	0,1	0,0000	0,0000	40,4	3290,9	81,4	0,0000	0,0000	ADM47405	proteína de choque térmico de masa molecular pequeña [Nicotiana tabacum]
1	BBB	MELO3C025139	1852,7	189,9	0,1	0,0000	0,0000	1852,7	157,4	0,4	0,0000	0,0013	223,6	5792,0	25,9	0,0000	0,0000	ADM47405	proteína de choque térmico de masa molecular pequeña [Nicotiana tabacum]
1	BBB	MELO3C021172	4697,3	673,7	0,1	0,0000	0,0000	4697,3	1160,9	0,5	0,0002	0,0315	1599,9	3878,2	2,4	0,0007	0,0430	XP_002880227	Atanogén 6 asociado a BCL-2 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]
1	BBB	MELO3C002020	5756,5	1131,6	0,2	0,0000	0,0000	5756,5	206,6	0,4	0,0000	0,0032	337,1	1608,5	4,8	0,0000	0,0000	AAX08108	proteína de choque térmico 101 [Vitis vinifera]
1	BBB	MELO3C026874	857,8	157,0	0,2	0,0000	0,0000	857,8	48,3	0,4	0,0003	0,0391	73,0	585,7	8,0	0,0000	0,0000	ADM47405	proteína de choque térmico de masa molecular pequeña [Nicotiana tabacum]
1	BBB	MELO3C006833	252,0	37,4	0,1	0,0000	0,0000	252,0	1,7	0,1	0,0001	0,0192	11,6	88,8	7,7	0,0000	0,0000	XP_002318188	proteína predicha [Populus trichocarpa]
1	BBB	MELO3C003195	107,3	16,5	0,2	0,0000	0,0000	107,3	6,1	0,0	0,0000	0,0000	13,4	57,2	4,3	0,0002	0,0179	XP_002534180	proteína de choque térmico, putativa [Ricinus communis]
1	BBB	MELO3C006935	9853,8	2844,1	0,3	0,0000	0,0000	9853,8	186,1	0,4	0,0001	0,0180	325,9	3182,2	9,8	0,0000	0,0000	XP_002513649	proteína de choque térmico, putativa [Ricinus communis]
1	BBB	MELO3C022499	307,3	79,1	0,3	0,0000	0,0000	307,3	4,5	0,2	0,0003	0,0391	16,3	136,2	8,4	0,0000	0,0000	XP_002320721	proteína predicha [Populus trichocarpa]
1	BBB	MELO3C010773	65,0	17,9	0,3	0,0002	0,0116	65,0	40,3	0,4	0,0001	0,0217	9,7	90,7	9,4	0,0000	0,0000	ABH02912	Factor de transcripción de tipo MYB MYB71 [Glycine max]
1	BBB	MELO3C002508	866,4	366,8	0,4	0,0003	0,0166	866,4	295,6	0,5	0,0001	0,0164	302,3	988,6	3,3	0,0000	0,0011	AAD33596	itorredoxina h [Hevea brasiliensis]
2	BB	MELO3C022116	1000,9	32,6	0,0	0,0000	0,0000	21,3	4,3	0,2	0,0020	0,1745	6,7	1514,5	225,7	0,0000	0,0000	XP_002519929	proteína de choque térmico, putativa [Ricinus communis]
2	BB	MELO3C018485	681,3	37,2	0,1	0,0000	0,0000	681,3	13,7	0,5	0,0565	1,0000	11,9	437,1	36,8	0,0000	0,0000	XP_002521274	proteína de choque térmico putativa [Ricinus communis]
2	BB	MELO3C025135	1245,0	103,4	0,1	0,0000	0,0000	1245,0	7,6	0,5	0,1667	1,0000	11,3	467,9	41,4	0,0000	0,0000	AAD49336	proteína de choque térmico de bajo peso molecular [Nicotiana tabacum]
2	BB	MELO3C018023	1232,5	184,1	0,1	0,0000	0,0000	1232,5	59,2	0,5	0,0041	0,2815	108,7	295,7	2,7	0,0005	0,0291	ADN33815	Proteasa del sitio 2 de la proteína de unión a elementos reguladores

2	BB	MELO3C004433	1794,3	279,2	0,2	0,0000	0,0000	1794,3	352,3	0,6	0,0024	0,2014	532,9	1263,8	2,4	0,0012	0,0608	XP_002531446	de esteroides [<i>Cucumis melo</i>] proteína de unión a iones de calcio, putativa [<i>Ricinus communis</i>]
2	BB	MELO3C024086	1469,6	255,5	0,2	0,0000	0,0000	1469,6	73,1	0,6	0,0418	1,0000	122,4	446,5	3,6	0,0000	0,0006	XP_002526446	proteína de choque térmico, putativa [<i>Ricinus communis</i>]
2	BB	MELO3C006536	415,6	62,4	0,2	0,0000	0,0000	415,6	24,7	0,4	0,0037	0,2635	30,0	185,6	6,2	0,0000	0,0000	NP_001148098	Proteína1 de choque térmico de 70 kDa [<i>Zea mays</i>]
2	BB	MELO3C015515	60,2	393,2	6,5	0,0000	0,0000	60,2	1846,2	1,7	0,0066	0,3958	456,6	1031,6	2,3	0,0016	0,0774	Q9ZRA4	Nombre: completo = proteína de unión a auxina ABP19a; Etiquetas: Precursor
2	BB	MELO3C003177	271,8	40,9	0,2	0,0000	0,0000	271,8	43,0	0,4	0,0026	0,2108	40,0	73,1	1,8	0,0759	1,0000	XP_002534074	Transportador de péptidos, putativo [<i>Ricinus communis</i>]
2	BB	MELO3C016897	5196,4	1190,0	0,2	0,0000	0,0000	5196,4	70,3	0,6	0,0156	0,6527	111,7	6477,3	58,0	0,0000	0,0000	ACY93250	Proteína de choque térmico pequeña CII 1 [<i>Prunus salicina</i>]
2	BB	MELO3C015804	1495,2	372,0	0,2	0,0000	0,0000	1495,2	19,5	0,6	0,0751	1,0000	29,8	500,78	16,8	0,0000	0,0000	XP_002517070	Proteína HSF30 de tipo factor de choque térmico, putativa [<i>Ricinus communis</i>]
2	BB	MELO3C003331	283,8	62,0	0,2	0,0000	0,0000	283,8	31,0	0,6	0,1165	1,0000	24,3	29,0	1,2	0,6588	1,0000	XP_002873020	proteína hipotética ARALYDRAFT_486956 [<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>]
2	BB	MELO3C003331	283,8	62,0	0,2	0,0000	0,0000	283,8	31,0	0,6	0,1165	1,0000	24,3	29,0	1,2	0,6588	1,0000	XP_002873020	proteína hipotética ARALYDRAFT_486956 [<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>]
2	BB	MELO3C004434	685,6	185,5	0,3	0,0000	0,0000	685,6	227,2	0,4	0,0001	0,0155	308,5	697,6	2,3	0,0024	0,1076	ADN34124	proteína rica en serinas [<i>Cucumis melo</i> subsp. <i>melon</i>]
2	BB	MELO3C019254	90,8	284,0	3,1	0,0000	0,0009	90,8	48,8	1,6	0,1036	1,0000	82,6	49,9	0,6	0,1211	1,0000	BAC79616	Proteína 1 de unión a GTP promotora del tabique, putativa (GTPasa spg) [<i>Oryza sativa</i>]
2	BB	MELO3C023497	25,5	2,0	0,1	0,0000	0,0012	25,5	111	0,6	0,2883	1,0000	13,0	22,9	1,8	0,2333	1,0000	XP_002531706	Precursor de proteína de transferencia inespecífica de lípidos, supuesto [<i>Ricinus communis</i>]
2	BB	MELO3C005923	303,6	106,8	0,4	0,0000	0,0027	303,6	61,0	0,3	0,0000	0,0001	96,1	166,3	1,7	0,0643	0,9995	XP_002867485	proteína pequeña de choque térmico del cloroplasto [<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>]
2	BB	MELO3C025085	528,1	198,5	0,4	0,0001	0,0039	528,1	26,7	0,5	0,0131	0,5872	39,0	263,1	6,7	0,0000	0,0000	BOLSA09378	Proteína pequeña de choque térmico del peroxisoma [<i>Glycine max</i>]
2	BB	MELO3C005629	175,4	58,9	0,3	0,0001	0,0060	175,4	149,4	2,2	0,0010	0,1065	55,5	158,3	2,9	0,0004	0,0271	ABH08746	Factor de transcripción 1 similar a CBF/DREB [<i>Citrus trifoliata</i>]

2	BB	MELO3C002513	519,6	206,1	0,4	0,0001	0,0093	519,6	50,8	0,5	0,0077	0,4330	82,5	288,2	3,5	0,0000	0,0016	NP_567623	Proteína de la familia de barriles TIM de tipo aldolasa [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
2	BB	MELO3C024263	182,0	67,9	0,4	0,0003	0,0167	182,0	54,9	0,2	0,0000	0,0000	79,7	154,0	1,9	0,0250	0,5632	XP_002515999	proteína intrínseca del tonoplasto, putativa [<i>Ricinus communis</i>]
2	B	MELO3C020963	338,8	87,0	0,3	0,0000	0,0000	338,8	155,9	1,7	0,0150	0,6359	510,2	106,9	0,2	0,0000	0,0000	XP_002533354	Factor de transcripción WRKY, putativo [<i>Ricinus communis</i>]
2	B	MELO3C021168	108,2	246,0	2,3	0,0011	0,0495	108,2	114,0	2,3	0,0009	0,0974	125,8	75,2	0,6	0,0921	1,0000	XP_002511954	Precursor de esterasa, putativo [<i>Ricinus communis</i>]
2	B	MELO3C011948	68,4	20,8	0,3	0,0004	0,0201	68,4	21,4	1,7	0,2273	1,0000	33,6	13,0	0,4	0,0258	0,5767	XP_002530026	Proteína que contiene repeticiones ricas en leucinas, putativa [<i>Ricinus communis</i>]
2	B	MELO3C003911	261,9	112,4	0,4	0,0009	0,0401	261,9	294,5	1,8	0,0042	0,2851	463,2	268,1	0,6	0,0441	0,7727	XP_002512304	copina, putativa [<i>Ricinus communis</i>]

Referencias

- Anders S. (2010). Analysing RNA-Seq data with the DESeq package. *Molecular biology*, 1-17.
- Cabezas JA, Cervera MT, Ruiz-Garcia L, Carreño J, Martínez-Zapater JM (2006) A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome*, 49: 1572-1585.
- 5 Cowan AK, Cripps RF, Richings EW, Taylor NJ (2001) Fruit size: towards an understanding of the metabolic control of fruit growth using avocado as a model system. *Physiologia Plantarum*, 111: 127-136.
- Dathan N, Zaccaro L, Esposito S, Isernia C, Omichinski JG, Riccio A, ... y Pedone, P. V (2002). The Arabidopsis SUPERMAN protein is able to specifically bind DNA through its single Cys2-His2 zinc finger motif. *Nucleic acids research*, 30: 4945-4951
- 10 DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, ... y Daly MJ (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics*, 43(5), 491-498.
- Gidoni D, Carmi N (2007) Mutagenesis for seedlessness in *Citrus*. *Israel J. Plant Sci.* 55: 133-135.
- Grumet R, Katzir N, Little HA, Portnoy V, Burger Y (2007) New insights into reproductive development in melon (*Cucumis melo* L.). *Intl J Plant Development Biol*: 253-264.
- 15 Jiang CJ, Aono M, Tamaoki M, Maeda S, Sugano S, Mori M, Takatsuji H (2008) SAZ, a new SUPERMAN-like protein, negatively regulates a subset of ABA-responsive genes in Arabidopsis. *Molecular Genetics and Genomics*, 279: 183-192.
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*, 14: R36.
- 20 Klug A (2010) The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual review of biochemistry*, 79: 213-231.
- Klug A, Schwabe JW (1995) Protein motifs 5. Zinc fingers. *The FASEB journal*, 9: 597-604.
- Lee MS, Gippert GP, Soman KV, CaseDA, Wright PE (1989) Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science*, 245: 635-637.
- 25 Liu QL, Xu KD, Ma N, Zhao LJ, Xi L (2014) Overexpression of a novel chrysanthemum SUPERMAN-like gene in tobacco affects lateral bud outgrowth and flower organ development. *Plant Physiology and Biochemistry* 77: 1-6.
- Mejía N, Soto B, Guerrero M, Casanueva X, Houel C, de los Ángeles Miccono, M, Adam-Blondon AF (2011) Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL1 in stenospermiocarpic seedlessness in grapevine. *BMC plant biology*, 11: 57.
- 30 Menda N, Semel Y, Peled D, Eshed Y, Zamir D (2004) *In silico* screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant J.* 38:861-872.
- Papadopoulou E, Little HA, Hammar SA, Grumet R (2005) Effect of modified endogenous ethylene production on sex expression, bisexual flower development and fruit production in melon (*Cucumis melo* L.). *Sexual plant reproduction*, 18: 131-142.
- 35 Tadmor Y, Larkov O, Meir A, Minkoff M, Lastochkin E, Edelstein E, Levin S, Wong J, Rocheford T y Lewinsohn E. (2000) Reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of vitamin E components in maize kernels. *Phytochem. Anal.* 11: 370-374
- Tadmor Y, King S, Levi A, Davis A, Meir A, Wasserman B, Hirschberg J y Lewinsohn E. (2005) Comparative fruit colouration in watermelon and tomato. *Food Res. Int.* 38: 837-841.
- 40 Tadmor Y, Katzir N, Meir A, Yaniv-Yaakov A, Sa'ar U, Baumkoler F, Lavee T, Lewinsohn E, Schaffer AA, Burger J (2007) Induced mutagenesis to augment the natural genetic variability of melon (*Cucumis melo* L.). *Israel J. Plant Sci.* 55: 159-169.

REIVINDICACIONES

1. Una planta de *Cucumis melo* o una parte de ella, en donde la planta contiene más de 12 frutos, en donde dichos frutos son sin semillas, en donde ambos alelos del genoma de la planta tienen una mutación de pérdida de función en la SEQ ID n.º 7 que da como resultado un rasgo sin semillas.
- 5 2. Una planta de *Cucumis melo* que tiene una forma heterocigota de la SEQ ID n.º 7 en la que un alelo de la SEQ ID n.º 7 tiene una mutación de pérdida de función de tal manera que, tras la autopolinización, el 25 % de la F₁ da más de 12 frutos, en donde dichos frutos son sin semillas.
3. La planta de acuerdo con la reivindicación 1, que da más de 15 frutos o da más de 20 frutos.
4. La planta de acuerdo con la reivindicación 1, en la que ambos alelos de dicha SEQ ID n.º 7 tienen una mutación F/I en la posición 97 de la misma.
- 10 5. Un esqueje de una planta de *C. melo* de la planta de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde ambos alelos del genoma del esqueje tienen una mutación de pérdida de función en la SEQ ID n.º 7 de manera que la planta desarrollada a partir del esqueje da más de 12 frutos, en donde dichos frutos son sin semillas; o en el que el esqueje tiene una forma heterocigota de la SEQ ID n.º 7 de manera que tras la autopolinización de la planta desarrollada a partir del esqueje, el 25 % de la F₁ produce más de 12 frutos, en donde dichos frutos son sin semillas.
- 15 6. Una pluralidad de semillas de *C. melo* que tienen una forma heterocigótica de la SEQ ID n.º 7 en las que un alelo de la SEQ ID n.º 7 tiene una mutación de pérdida de función que, al plantar las mismas, provoca un fenotipo de cultivo de fruta mejorado en el 25 % de las plantas derivadas de las mismas, y en las que dicho 25 % de las plantas dan más de 5 frutos, en donde dichos frutos son sin semillas.
- 20 7. Un polinucleótido aislado que comprende la secuencia que se presenta en la SEQ ID n.º 9.
8. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia como la presentada en la SEQ ID n.º 8.
9. Un método de selección asistida por marcadores de una planta de *C. melo* que tiene un rendimiento mejorado de frutos o que tiene una progenie con un rendimiento mejorado, en donde el método comprende usar oligonucleótidos que distinguen entre las formas mutada y no mutada de la SEQ ID n.º 7 cuando se analiza la presencia de una mutación de pérdida de función en ambos alelos de la SEQ ID n.º 7, en donde la presencia de dicha mutación en ambos alelos de la SEQ ID n.º 7 es indicativa de que la planta o su descendencia producirá más de 5 frutos sin semillas.
- 25



FIG. 1

FIG. 2

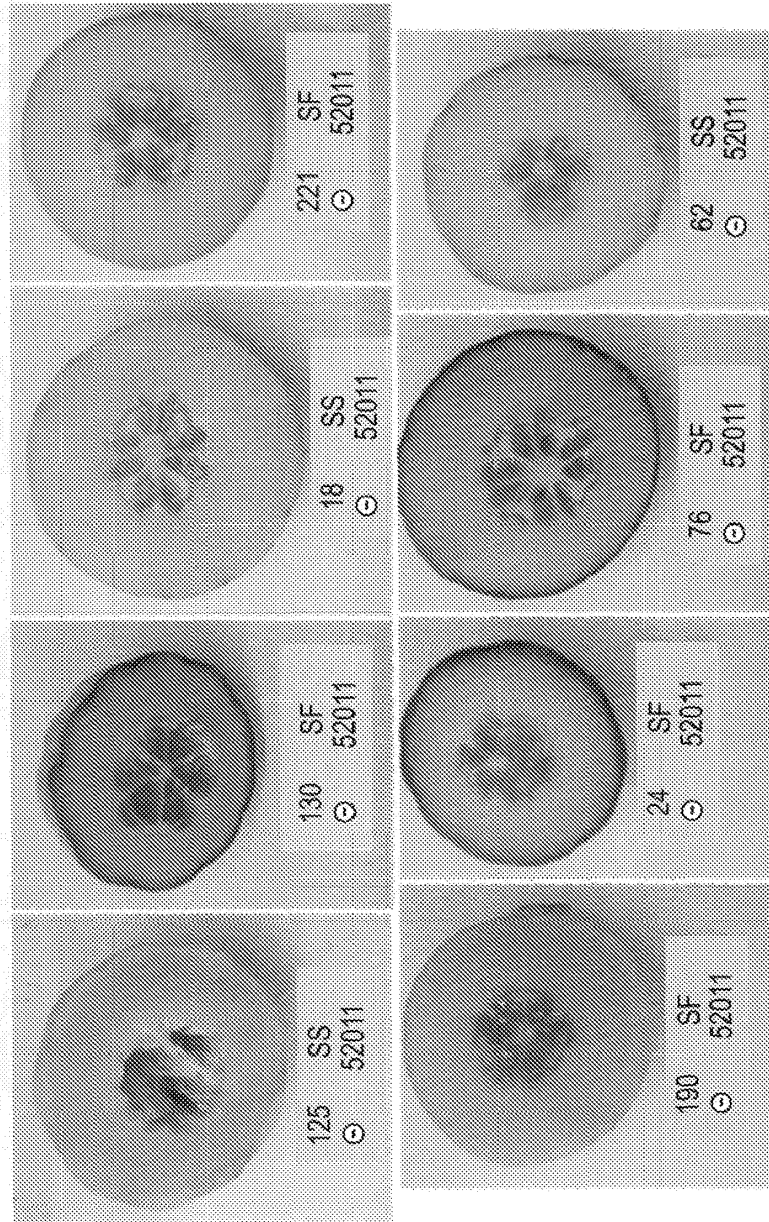


FIG. 3

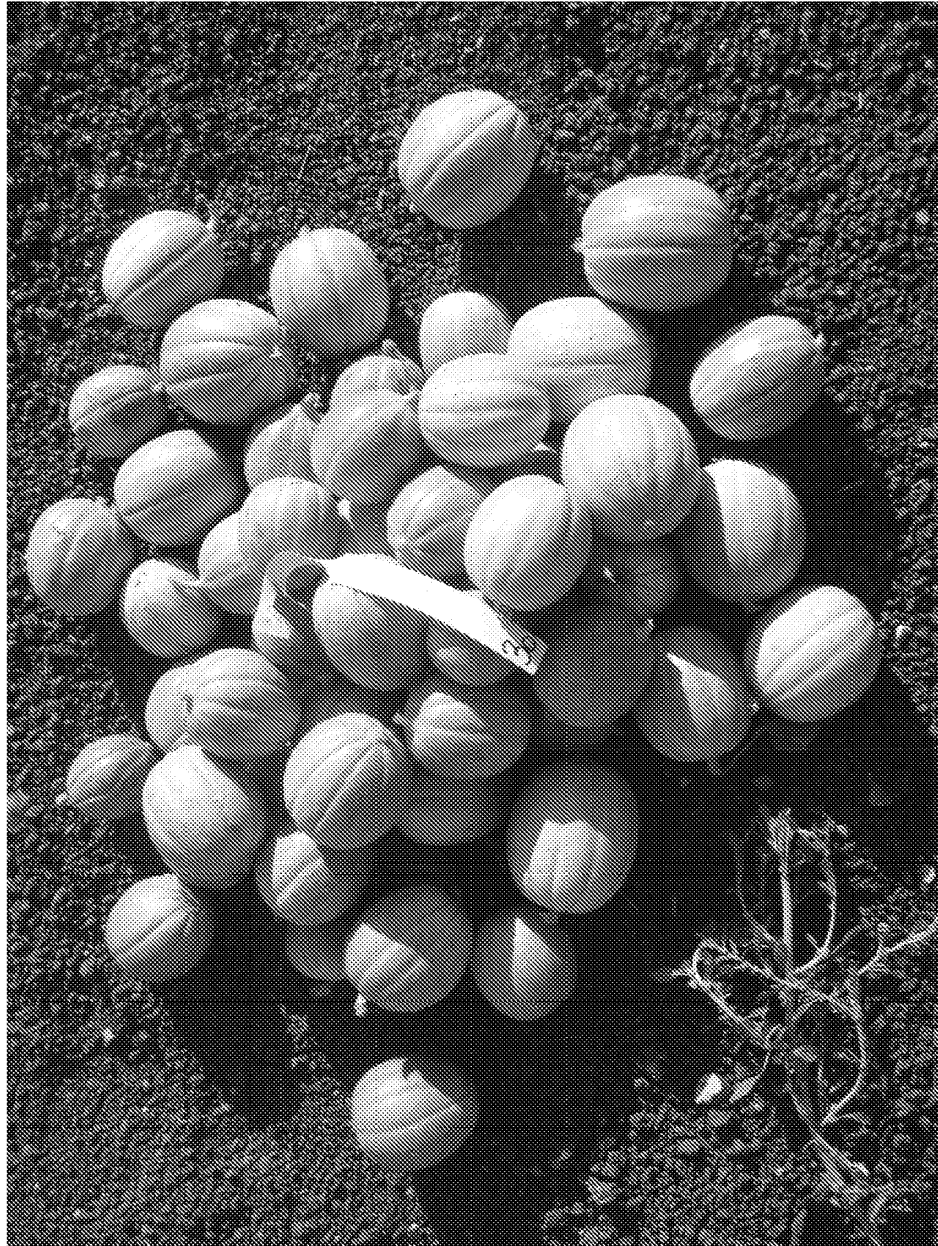


FIG. 4A

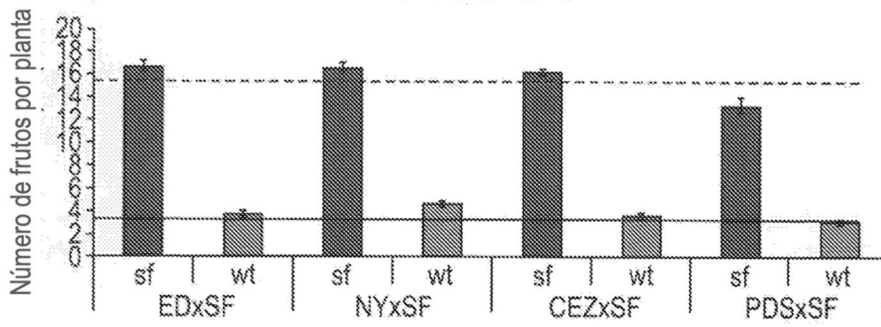


FIG. 4B

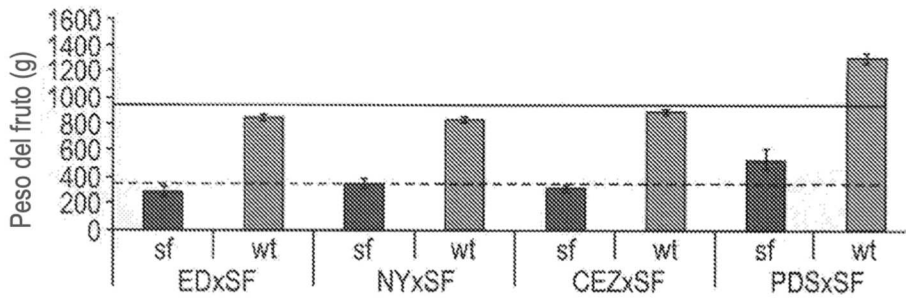
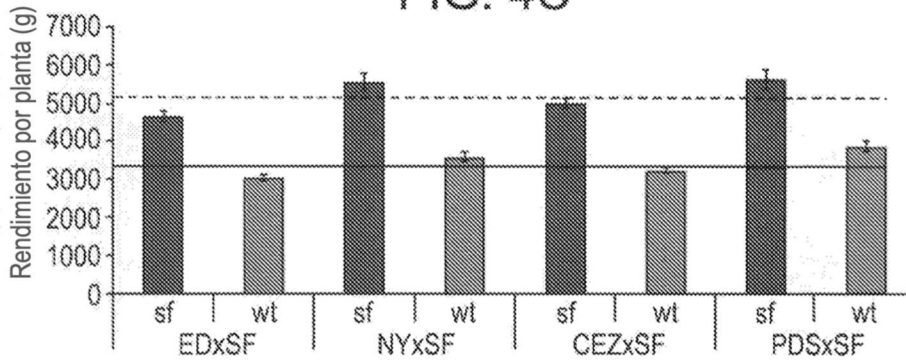


FIG. 4C



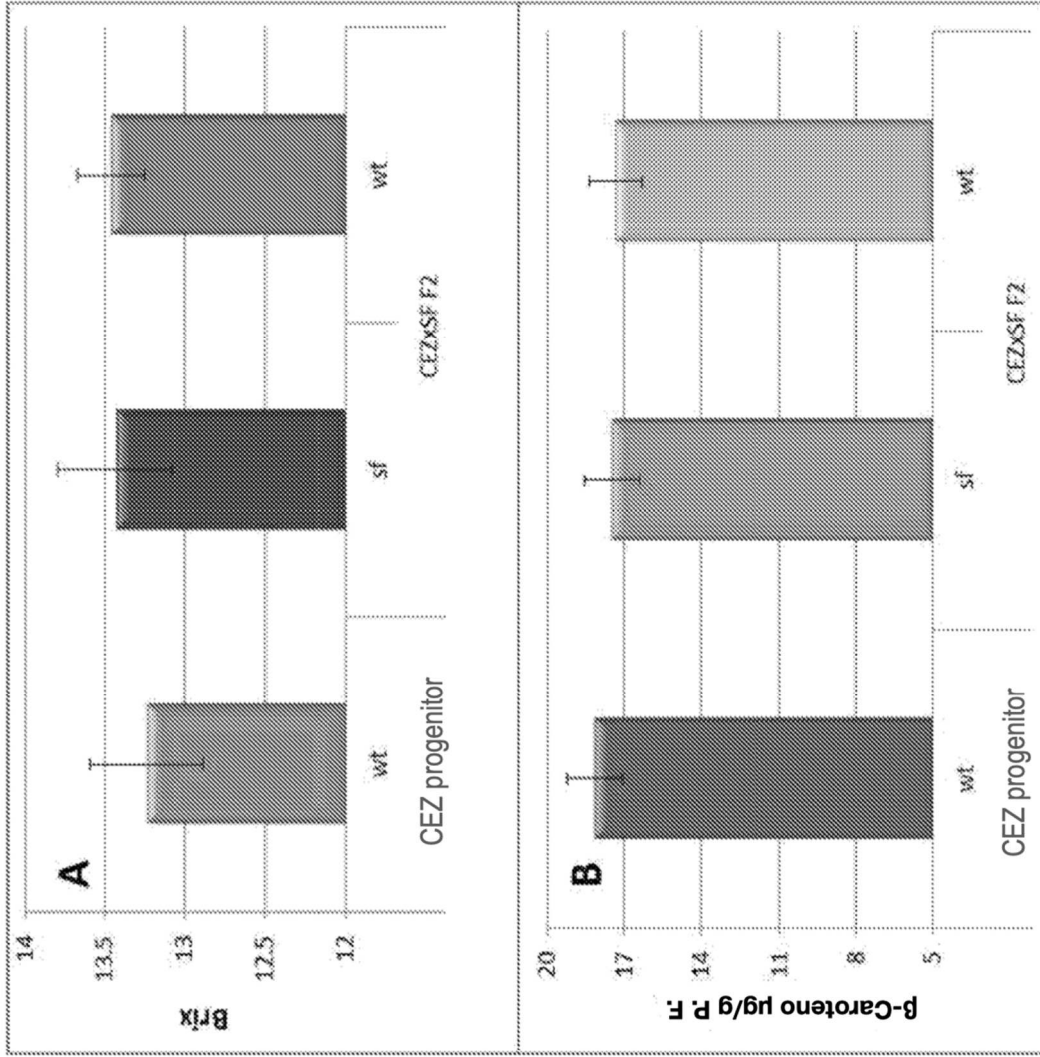


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 6

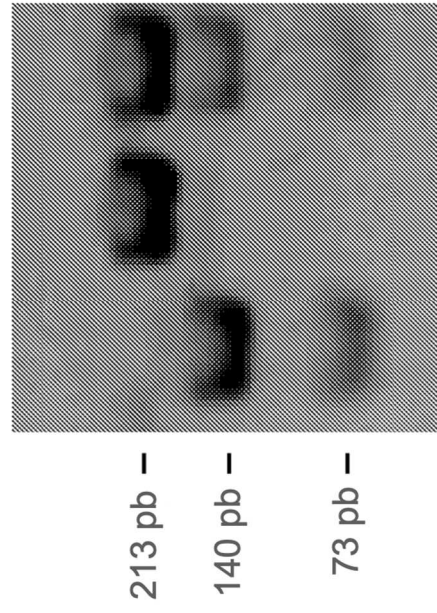


FIG. 7

tipo silvestre **CHYCCRNIFTSQALGGHQN**AH****
'sf' **CHYCCRNIFTSQALGGHQN**AH****

FIG. 8A

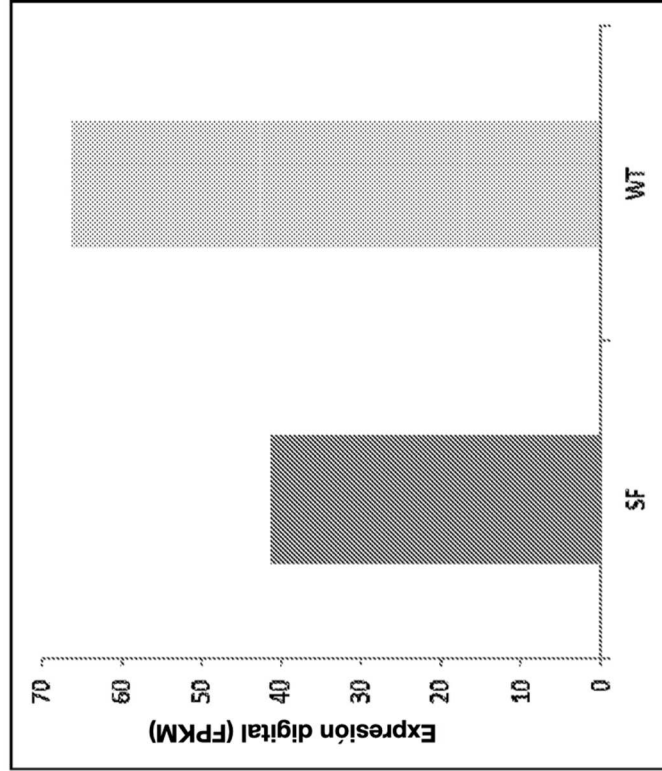


FIG. 8B

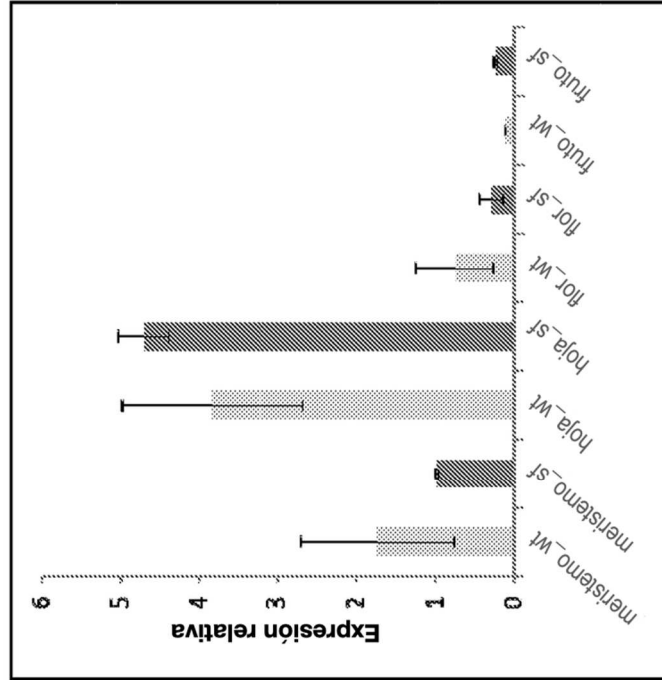


FIG. 9

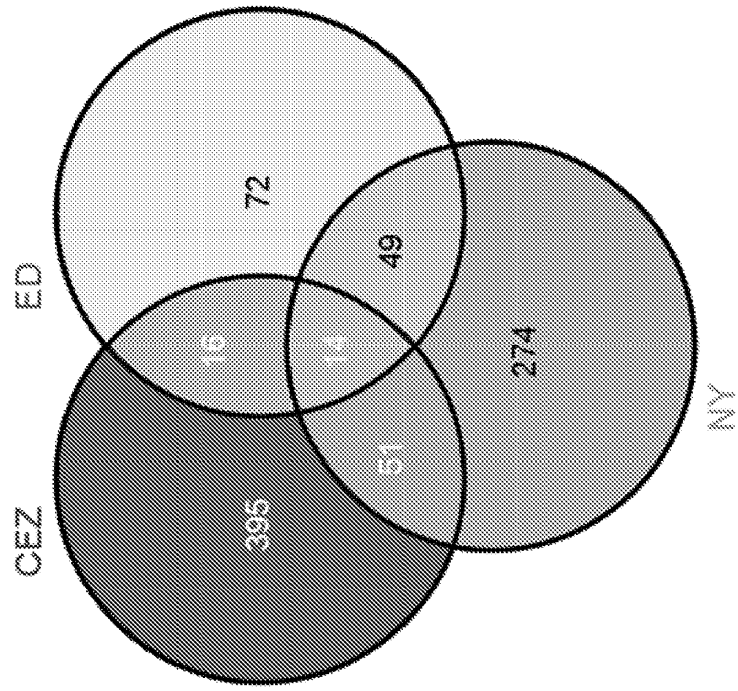


FIG. 10B

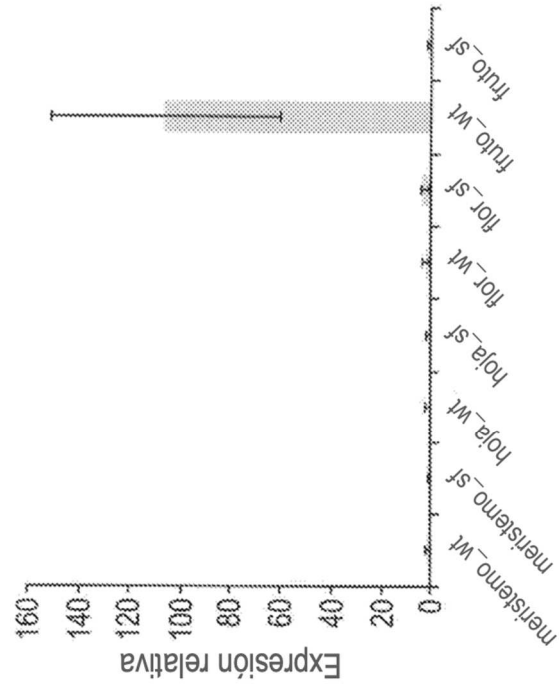


FIG. 10A

