

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 877 278**

51 Int. Cl.:

A01H 5/08 (2008.01)

A01H 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2013** **PCT/EP2013/052544**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013** **WO13120781**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2013** **E 13703094 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021** **EP 2814316**

54 Título: **Plantas de sandía triploides con hábito de crecimiento de arbusto**

30 Prioridad:

13.02.2012 EP 12155065

13.02.2012 US 201261597985 P

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

16.11.2021

73 Titular/es:

NUNHEMS B.V. (100.0%)

Napoleonsweg 152
6083 AB Nunhem, NL

72 Inventor/es:

DE GROOT, ERIK y
CHIAPPARINO, ELENA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 877 278 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 sandía triploides con hábito de crecimiento de arbusto

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo del cultivo y mejora de las plantas. Se proporcionan nuevas plantas híbridas de sandía y semillas a partir de las cuales se pueden cultivar dichas plantas, que tienen un hábito de crecimiento "*de*
arbusto" (que comprende el "*gen de arbusto*" recesivo, designado "*b*") y son triploides ($2n = 3x = 33$) en su composición cromosómica. Cuando estas plantas híbridas triploides se polinizan con polen diploide normal ($2n = 2x = 22$) (que se
 10 puede obtener de los polinizadores), estas plantas producen frutos triploides, sin semillas, de gran calidad. Como la planta híbrida triploide tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*, con vides cortas (iguales o inferiores a 150 cm, más
 15 preferentemente iguales o inferiores a 140 cm, especialmente iguales o inferiores a 100 cm) y una longitud de entrenudos corta, esta planta puede cultivarse a una mayor densidad en el campo en comparación con los híbridos tradicionales de sandía triploide *no de arbusto*, lo que da lugar a una mayor producción de fruta por hectárea en
 20 comparación con los híbridos triploides con hábito de crecimiento normal (que tienen una longitud promedio de la vid más larga mayor que 200 o mayor que 300 cm). El diámetro promedio de un planta *de arbusto* triploide de acuerdo con la invención es igual o menor que 300 cm, preferentemente 280 cm, especialmente igual o menor que 200 cm, mientras que otras características, tal como el tamaño de las hojas y el tamaño de los frutos, son similares a las de las plantas de sandía triploide de crecimiento normal. También se proporcionan plantas de sandía *de arbusto* diploides endogámicas (*bb*) y plantas de sandía *de arbusto* tetraploides endogámicas ($2n = 4x = 44$) (*bbbb*), que se utilizan como progenitores masculinos y femeninos, respectivamente, para producir las plantas de sandía *de arbusto* híbridas triploides (*bbb*) de acuerdo con la invención. Además, se proporcionan frutos triploides, sin semillas, obtenibles a partir de las plantas *de arbusto* triploides de acuerdo con la invención, así como semillas a partir de las cuales se pueden cultivar las plantas híbridas *de arbusto* triploides. Se proporcionan otros procedimientos para cultivar híbridos *de arbusto* triploides.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25 Las sandías sin semillas (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. y Nak.) se producen utilizando el polen de plantas parentales masculinas diploides para fecundar las flores de plantas parentales maternas tetraploides. La polinización de las flores tetraploides con polen diploide da lugar a semillas híbridas F1 que son triploides (Kihara, 1951, Proceedings of American Society for Horticultural Science 58: 217-230 Eigsti 1971, Hort Science 6: 1-2). Las plantas híbridas triploides cultivadas a partir de estas semillas F1 son autoinfértiles, ya que producen polen estéril debido al
 30 desequilibrio cromosómico (Fehr, 1987). Los híbridos triploides, por tanto, necesitan ser polinizados por un polinizador diploide para producir frutos de sandía.

Por lo tanto, las plantas triploides se intercalan con plantas polinizadoras para la producción de frutos. Los frutos "sin semillas" producidos tras la polinización en la planta híbrida triploide no son realmente sin semillas, sino que a menudo contienen algunas semillas no desarrolladas, pequeñas y pálidas, que son comestibles.

35 Para que el cuajado de los frutos sea óptimo, se requiere suficiente polen viable. Generalmente, las plantas se plantan en una proporción de 1 polinizador por cada 2-4 plantas triploides. Las plantas triploides y las polinizadoras se plantan en hileras separadas (por ejemplo, 1 hilera de polinizadoras y 2-4 hileras de triploides), o se intercalan dentro de las hileras (por ejemplo, plantando 1 planta polinizadora entre 2 y 3 plantas triploides en la misma hilera), o se intercalan en hileras estrechas entre hileras de triploides (véase el documento US 2006/0168701 Tabla 2). Los frutos producidos
 40 en las plantas polinizadoras tienen preferentemente un patrón de corteza diferente al de los frutos de los híbridos triploides, para que estos puedan distinguirse fácilmente.

Aún persisten algunos problemas en la producción de sandías sin semillas, tal como la producción de la línea madre tetraploide (duplicación de cromosomas mediante el tratamiento con colchicinas de las plántulas), la búsqueda de compatibilidad entre el polen diploide y las plantas madre tetraploides y las semillas triploides suelen tener una capa
 45 de semillas más gruesa, lo que disminuye su vigor y germinación. La calidad y uniformidad de los frutos también suele ser un problema, así como los elevados costos de producción de las semillas triploides debido a los requisitos mencionados.

Conseguir una línea madre tetraploide estable con el rasgo o rasgos deseados no es sencillo, dado que no es tan simple como seleccionar un buen diploide y duplicar los cromosomas utilizando, por ejemplo, un tratamiento con colchicinas. Una vez que se obtienen algunas células con cromosomas duplicados y se regenera una planta, son
 50 necesarias varias generaciones de autopolinización (endogamia) para estabilizar (fijar) el tetraploide y eliminar las aberraciones cromosómicas no deseadas.

Las plantas polinizadoras diploides compactas (o enanas) que tienen vides más cortas y/o entrenudos más cortos se utilizan a menudo para inducir el cuajado de frutos sin semillas en progenitores femeninos híbridos normales (no enanas) y/o para producir frutos con semillas en la propia planta polinizadora. Por ejemplo, la variedad Side Kick (Harris Morin) se utiliza como polinizador para los híbridos triploides normales (sin semillas) y/o para la producción de
 55 frutos polinizadores (con semillas). Side Kick es un polinizador diploide que comprende el alelo

recesivo *hmbn* (documento US 7.314.979 B2) en forma homocigota, que da lugar a plantas polinizadoras diploides más ramificadas (multibranching) y, por tanto, más "compactas". También los frutos polinizadores diploides de las plantas homocigóticas *hmbn* son más pequeños que los frutos normales (1,6 kg versus los 8,98 kg de un diploide normal). Por otro lado, los frutos triploides sin semillas que se producen cuando se poliniza un híbrido triploide normal con un polinizador tal como Side Kick son frutos grandes y sin semillas de 5,8 a 9,5 kg (13-21 libras). El tipo compacto HMBN (*hmbn hmbn*) no es tan compacto como los mutantes enanos diploides conocidos (*dw-1 dw-1*, tal como la variedad Bush Jubilee o *dw-2 dw-2*, tal como la variedad J86), pero es más compacto que los tipos diploides estándar (por ejemplo, Allsweet), véase la Tabla 1 del documento US 7.314.979 y la Tabla 1 del documento US 8.034.999. El tipo compacto HMBN (*hmbn hmbn*) tiene muchas más ramas secundarias (promedio de 44,9) que un diploide normal (promedio de 14,7) o que un diploide enano conocido (promedio de 19,3 y 7,3), mientras que la longitud de los entrenudos es mayor (promedio de 4,4 cm) que en los diploides enanos conocidos (promedio de 3,4 y 4,1 cm), pero más corta que en los diploides de tipo normal (promedio de 7,2 cm).

El documento US 7.164.059 describe un polinizador diploide de vid corta y su uso para polinizar híbridos triploides de hábito de crecimiento normal (tipo de crecimiento normal). El polinizador de vides cortas se describe como aquel que tiene una longitud promedio de entrenudos menor que 3 pulgadas (menor que 7,6 cm) y/o un diámetro de planta menor que 1,8 metros. Utilizando un polinizador de vides cortas en combinación con triploides de hábito normal se afirma que se puede plantar entre un 33% y un 50% más de triploides por acre (aproximadamente 2000 triploides por acre, más 400 a 1200 polinizadores diploides por acre; esto equivale a aproximadamente 4942 triploides por hectárea, más 988 a 2965 polinizadores diploides por hectárea).

El documento US 7.115.800 describe la producción de frutos de sandía sin semillas con un peso promedio menor que 5,4 kg (3,6 a 4,0 kg). Las plantas de sandía triploides se producen utilizando líneas parentales tetraploides endogámicas "pequeñas" y diploides endogámicas "pequeñas", en el que "pequeñas" se refiere al tamaño del fruto y no al de la planta. Las plantas híbridas triploides, que producen frutos pequeños, tienen un tipo de crecimiento normal, con longitudes de vid de 320 cm o más y longitudes de entrenudos de 8 cm o más.

Los documentos US 2008/0005814 y US 2008163388 describen el desarrollo de una planta de sandía tetraploide, que es adecuada como progenitor femenino en la producción de híbridos triploides que tienen frutos pequeños y sin semillas. La planta tetraploide tiene un hábito de crecimiento vegetativo normal. Cuando se poliniza con un polinizador diploide, se producen frutos pequeños (de 1,5 a 2,5 kg). El documento US2008/0244764 describe una línea de sandía tetraploide de tipo de crecimiento normal desarrollada a partir de la diploide Calsweet.

Los documentos US 2006/0168701 y US 2003/0172414 describen polinizadores diploides ("Súper Polinizadores") útiles para polinizar plantas triploides, iniciando así la fructificación de frutos triploides sin semillas. El polinizador tiene hojas pequeñas, de 5 a 12 veces menores que la superficie de un polinizador diploide típico, tal como la Sangría y puede cultivarse muy cerca del híbrido triploide de tipo normal. El polinizador está altamente ramificado (vid enlazada o vid abierta) y reduce el espacio, los nutrientes y la luz necesarios, dejando más espacio, nutrientes y luz para las plantas híbridas triploides. De acuerdo con la solicitud de patente, se produce entre un 25% y un 33% más de sandías sin semillas por acre utilizando este polinizador.

El documento US 6.355.865 B1 describe una planta polinizadora que tiene al menos dos de las características seleccionadas de (a) un fenotipo de fruto distinguido, (b) un número elevado de flores masculinas, (c) una floración continuada, (d) una floración temprana y/o (e) una morfología de planta y un hábito de crecimiento modificados, con vides más esbeltas. Como el polinizador diploide es más esbelto y produce más flores, puede plantarse en una proporción de 1:3 a 1:5 (polinizador:híbrido triploide), en lugar de la proporción habitual de 1:2.

Además de la mutación *hmbn* (mutlibranching) descrita anteriormente, también se han descrito otros cuatro genes que conducen a un hábito de planta enana/compacta en sandías diploides cuando el alelo mutante está presente en forma homocigota. Se denominan *dw-1*, *dw-1^s* (alélico de *dw-1*), *dw-2* y *dw-3* (Guner and Wehner 2004, Hort Science 39(6): 1175-1182). Algunos de estos mutantes se han utilizado para desarrollar polinizadores diploides enanos o de vid corta, tal como Bush Jubilee.

Sin embargo, hasta ahora no ha sido posible producir plantas híbridas *de arbusto* triploides, capaces de producir frutos sin semillas de alta calidad.

Es un objeto de la invención proporcionar híbridos triploides con un hábito de crecimiento *de arbusto* y que produzcan frutos sin semillas de alta calidad. También se proporcionan procedimientos de producción de dichas plantas híbridas triploides y/o frutos triploides.

Las plantas triploides *de arbusto* ocupan menos espacio en el campo y pueden cultivarse más cerca unas de otras y/o de los polinizadores en comparación con los triploides de tipo normal, tal como Boston F1 o Fashion F1. Se pueden cultivar al menos 1,5 veces, 1,7 veces, 2 veces, 2,5 veces o incluso 3 veces más plantas triploides *de arbusto* por hectárea en comparación con los híbridos triploides de sandía *no de arbusto* (hábito de crecimiento normal), tal como Boston F1 o Fashion F1. Como las plantas triploides *de arbusto* tienen un diámetro de planta reducido, pero sin que ello afecte al tamaño de las hojas o de los frutos, se puede conseguir un mayor rendimiento de frutos triploides por hectárea. Utilizando los híbridos de arbusto triploides de acuerdo con la invención se producen al menos

aproximadamente 1,25 veces, preferentemente al menos aproximadamente 1,5 veces más frutos por hectárea en comparación con los híbridos triploides de tipo normal.

En una realización también se proporciona un procedimiento de cultivo de plantas de sandía triploide *de arbusto* en la producción comercial de fruta sin semillas.

- 5 También se incluyen en la presente memoria semillas a partir de las cuales se pueden cultivar plantas *de arbusto* híbridas triploides, así como partes de plantas, propagaciones *in vitro*, cultivos de células o tejidos, frutos cosechados, etc.

- 10 En otra realización se proporcionan plantas *de arbusto* tetraploides y semillas a partir de las cuales se pueden cultivar dichas plantas *de arbusto* tetraploides, así como partes de plantas (células, polen, anteras, óvulos, flores, etc.) y propagaciones *in vitro* de dichas plantas.

DEFINICIÓN GENERAL

- 15 El verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitativo para significar que los elementos que siguen al término están incluidos, pero que los elementos no mencionados específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que haya más de un elemento, a menos que el contexto exija claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. De este modo, el artículo indefinido "un" o "una" suele significar "al menos una", por ejemplo, "una planta" se refiere también a varias plantas de células, etc. Del mismo modo, "un fruto" o "una planta" también se refiere a una pluralidad de frutas y plantas.

- 20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "planta" incluye la planta entera o cualquier parte o derivado de la misma, preferentemente con la misma composición genética que la planta de la que se obtiene, tal como órganos vegetales (por ejemplo, frutos cosechados o no, hojas, flores, anteras, etc.), células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejidos celulares vegetales a partir de los cuales se pueden regenerar plantas enteras, callos vegetales, grupos de células vegetales, trasplantes vegetales, plántulas, células vegetales intactas en plantas, clones vegetales o micropropagaciones, o partes de plantas, tal como esquejes vegetales, embriones, polen, anteras, óvulos, frutos (por ej., tejidos u órganos cosechados), flores, hojas, semillas, plantas reproducidas por clonación, raíces, tallos, puntas de raíces, injertos (vástagos y/o portainjertos) y similares. También se incluye cualquier fase de desarrollo, tal como plántulas, esquejes antes o después de enraizar, etc.

- 30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "variedad" o "cultivo" significa una agrupación de plantas dentro de un único taxón botánico del intervalo más bajo conocido, que puede definirse por la expresión de las características resultantes de un determinado genotipo o combinación de genotipos.

- 35 El término "alelo(s)" significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen en un locus particular, todos cuyos alelos se refieren a un rasgo o característica en un locus específico. En una célula diploide de un organismo, los alelos de un determinado gen se encuentran en un lugar específico, o locus (loci en plural) en un cromosoma. Un alelo está presente en cada cromosoma del par de cromosomas homólogos. Una especie vegetal diploide puede comprender un gran número de alelos diferentes en un locus concreto. Pueden ser alelos idénticos del gen (homocigotos) o dos alelos diferentes (heterocigotos).

El término "locus" (loci en plural) significa un lugar o lugares específicos o un sitio en un cromosoma en el que, por ejemplo, se encuentra un gen o un marcador genético.

- 40 "Planta diploide" se refiere a una planta, partes vegetales de la planta o semilla a partir de la cual se puede cultivar una planta diploide, que tiene dos conjuntos de cromosomas, designados en la presente memoria como 2n.

"Planta triploide" se refiere a una planta, partes vegetales de la planta o semilla a partir de la cual se puede cultivar una planta triploide, que tiene tres juegos de cromosomas, designados en la presente memoria como 3n.

"Planta tetraploide" se refiere a una planta, partes vegetales de la planta o semilla a partir de la cual se puede cultivar una planta tetraploide, que tiene cuatro juegos de cromosomas, designados en la presente memoria como 4n.

- 45 "Planta polinizadora" o "polinizador" se refiere a la planta diploide (endogámica o híbrida), o a sus partes (por ejemplo, su polen o púa), adecuada como polinizador para inducir el cuajado de los frutos en las plantas triploides. Una planta polinizadora es, por tanto, capaz de provocar un buen cuajado (y un buen rendimiento de los frutos triploides) de las plantas triploides, al producir una cantidad adecuada de polen en el momento del día y durante un período de tiempo adecuado.

- 50 "Progenitor masculino" se refiere a la planta polinizadora utilizada como progenitor masculino para inducir el cuajado de los frutos y la producción de semillas en un progenitor femenino tetraploide, dando lugar a semillas híbridas triploides F1. Tanto el progenitor masculino como el femenino son consanguíneos, de modo que cada uno es casi homocigótico y estable. El "progenitor femenino" o "progenitor tetraploide" se refiere a la planta que se poliniza con el

polen del progenitor masculino, lo que conduce a la producción de frutos que contienen semillas triploides. El progenitor femenino es consanguíneo para que sea casi homocigoto y estable.

La "planta triploide híbrida" o "triploide F1" es una planta triploide cultivada a partir de una semilla híbrida, triploide, obtenida de la fecundación cruzada de un progenitor diploide masculino con un progenitor tetraploide femenino.

- 5 Los "frutos sin semillas" son frutos triploides que no contienen semillas maduras. El fruto puede contener uno o varios óvulos blancos, pequeños y comestibles.

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

"Plantación" o "plantado" se refieren a la siembra (siembra directa) o al trasplante de plántulas (plántulas) en un campo a máquina o a mano.

20 La "propagación vegetativa" se refiere a la propagación de plantas a partir de tejido vegetativo, por ejemplo, mediante la propagación *in vitro* o procedimientos de injerto (utilizando vástagos). La propagación *in vitro* implica el cultivo de células o tejidos *in vitro* y la regeneración de una planta completa a partir del cultivo *in vitro*. El injerto consiste en la propagación de una planta original mediante el injerto en un patrón. De este modo, se pueden generar clones (es decir, propagaciones vegetativas genéticamente idénticas) de la planta original, ya sea por cultivo *in vitro* o por injerto.

25 "Recesivo" se refiere a un alelo que expresa su fenotipo cuando no hay un alelo dominante funcional en el genoma. El alelo recesivo *de arbusto* (*b*) de acuerdo con la invención, tal como se encuentra en (y se puede obtener de) los números de acceso del NCIMB proporcionados en la presente memoria, da lugar a un hábito de crecimiento *de arbusto* cuando está presente en dos copias en una planta diploide (*bb*), en cuatro copias en una planta tetraploide (*bbbb*) o en tres copias en una planta triploide (*bbb*), por lo que un alelo *de arbusto* dominante funcional (*B*) está ausente en estas plantas. El alelo *B* es, por tanto, esencialmente el alelo de tipo salvaje, no mutado, que se encuentra en las plantas que carecen del alelo mutante *b*.

30 "Tipo *de arbusto*" o "tipo de crecimiento *de arbusto*" o "hábito de crecimiento *de arbusto*" o "hábito *de arbusto*" se refiere al hábito de crecimiento vegetativo heredable (determinado genéticamente por el alelo *de arbusto*) de una línea o variedad de plantas en la madurez que tiene una longitud promedio de entrenudos de aproximadamente 7 cm o menos (pero al menos aproximadamente 4,7 cm, preferentemente al menos aproximadamente 5,0 cm) y una longitud promedio de la vid más larga de aproximadamente 150 cm o menos, aproximadamente 140 cm o menos, aproximadamente 130 cm o menos, preferentemente aproximadamente 100 cm o menos (pero al menos aproximadamente 70 cm). Además, el tamaño promedio de las hojas no se ve reducido por el alelo *de arbusto* y es al menos de aproximadamente 11 cm de longitud y/o 15 cm de anchura o mayor. Un tipo de crecimiento "*no de arbusto*" es cualquier otro tipo (con un alelo *B*), como los tipos de crecimiento triploides normales (por ejemplo, Fashion F1 o Boston F1) que producen un promedio de vides más largas de bastante más de 100 cm, por ejemplo, generalmente más de 200 cm o más de 300 cm (véanse también los Ejemplos).

45 La "longitud de vid más larga" o la "longitud promedio de vid más larga" se refiere a la longitud promedio de la vid más larga de una pluralidad de plantas de una línea o variedad de sandía, cuando estas están completamente desarrolladas (en la madurez). La vid más larga también puede denominarse en la presente memoria tallo (por lo tanto, "tallo" y "vid más larga" se utilizan indistintamente en la presente memoria).

El "diámetro de planta" se refiere al diámetro promedio de una pluralidad de plantas de una línea o variedad de sandía cuando están completamente desarrolladas, es decir, el diámetro desde la punta de la vid más larga de un lado de la planta hasta la punta de la vid más larga del otro lado de la planta.

50 La "longitud de los entrenudos" se refiere a la longitud promedio de los entrenudos de una vid de una pluralidad de plantas de una línea o variedad específica.

El "número de entrenudos" se refiere al número promedio de entrenudos en una vid, por ejemplo, en la vid más larga.

El "retrocruzamiento" es un proceso por el que la progenie híbrida, por ejemplo un híbrido F1, se cruza repetidamente con uno de los progenitores del híbrido. El retrocruzamiento puede utilizarse para introducir una o varias conversiones de locus único de un entorno a otro.

55 A lo largo de la presente memoria, "promedio" y "media" se utilizan indistintamente y se refieren a la media aritmética.

La "conversión de un solo gen" o "un solo gen convertido" se refieren a las plantas desarrolladas por retrocruzamiento, en las que se conservan esencialmente todas las características morfológicas y fisiológicas deseadas de una planta (por ejemplo, una endogámica) además de un solo gen transferido a la planta mediante retrocruzamiento o ingeniería genética.

- 5 Por "rendimiento" se entiende el peso total de todos los frutos de sandía cosechados por hectárea de una línea o variedad determinada.

Por "rendimiento comercial" se entiende el peso total de todos los frutos de sandía comercializables, especialmente los frutos triploides sin semillas de al menos 2,5 kg, cosechados por hectárea de una línea o variedad determinada, es decir, frutos aptos para ser comercializados para el consumo en fresco, con un buen sabor (sin sabores extraños), al menos un 10% de brix y propiedades de color de la pulpa y que no presenten deficiencias como el corazón hueco.

10 La "prueba de alelismo" se refiere a una prueba genética por la que se puede comprobar si dos fenotipos observados en dos plantas están determinados por el mismo gen o por genes diferentes. Por ejemplo, si una planta *de arbusto* diploide homocigota (*bb*) se cruza con otra planta de sandía que es homocigota para un gen recesivo diferente, en un locus diferente (por ejemplo el alelo *hmbn* que determina la ramificación múltiple), la planta F1 no tendrá el tipo de crecimiento *de arbusto* ni el fenotipo de ramificación múltiple y la generación F2 segregará para los dos fenotipos (*de arbusto* y ramificación múltiple) de forma independiente, en una proporción de 9:3:3:1, es decir, 9 (*no de arbusto*/de ramificación múltiple) : 3 (*no de arbusto*/de ramificación múltiple) : 3 (*no de arbusto*/de ramificación múltiple) : 1 (*de arbusto*/de ramificación múltiple).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 En un aspecto de la invención se proporciona (una semilla de) una planta de la especie *Citrullus lanatus*, en la que dicha planta es triploide y tiene un hábito de crecimiento *de arbusto* (como se define en la presente memoria). La planta que comprende tres copias de un alelo recesivo designado *de arbusto*, en la que una muestra representativa de semilla que contiene dicho alelo se ha depositado con los números de acceso NCIMB 41907 (y/o NCIMB 41905 y NCIMB 41906). La ploidía puede determinarse fácilmente mediante el recuento de cromosomas o la citometría de flujo u otros procedimientos conocidos (Sari *et al.* 1999, Scientia Horticulturae 82:265-277).

El híbrido *de arbusto* triploide tiene, debido a la presencia del alelo *de arbusto* recesivo "*b*" (y la ausencia del alelo dominante *B*), una longitud de vid más larga no mayor que aproximadamente 150 cm, preferentemente no mayor que aproximadamente 140 cm, más preferentemente no más de aproximadamente 100 cm, por lo que el diámetro promedio de la planta es de aproximadamente 300 cm o menos, 280 cm o menos, o 200 cm o menos, y una longitud promedio de entrenudos en la vid más larga de aproximadamente 7 cm o menos, pero al menos de aproximadamente 4,7 cm, preferentemente al menos aproximadamente 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 o 7,0 cm. Se incluyen especialmente las plantas que tienen una longitud promedio de entrenudos de 6,0 cm o 7,0 cm, o de 6,0 a 7,0 cm. El alelo recesivo *de arbusto* no afecta al tamaño de la hoja, de modo que la planta de acuerdo con la invención comprende hojas de tamaño (promedio) similares a las que se encuentran en los híbridos triploides de tipo de crecimiento normal (tal como Boston F1), es decir, de al menos aproximadamente 11, 12, 13, 14 o 15 cm de largo y/o al menos aproximadamente 15 cm de ancho, abarcando longitudes promedio de hoja de al menos aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 cm y/o anchuras promedio de hoja de al menos aproximadamente 15, 16, 17, 18 o 19 cm. En una realización, el producto de la longitud promedio de la hoja multiplicado por la anchura media de la hoja es preferentemente de al menos aproximadamente 140 o 150, como por ejemplo de al menos aproximadamente 160, 170, 180, 190 o 200, o incluso de al menos aproximadamente 225, 250, 300 o más.

En una realización, la relación entre la longitud (promedio) de la vid más larga y el número (promedio) de entrenudos de la vid más larga es de 7 o menos. En otro aspecto, el híbrido *de arbusto* triploide no tiene más (en promedio) de 15 entrenudos en la vid más larga. Especialmente, el número de entrenudos en la vid más larga es de aproximadamente el 50% del número encontrado en Boston F1 o Fashion F1.

45 Además, el diámetro (promedio) del tallo, medido en el centro de la vid más larga, es mayor que en los híbridos triploides normales como Boston F1, por ejemplo, el diámetro promedio del tallo es al menos de aproximadamente 8 mm, preferentemente al menos de aproximadamente 9 mm e incluso puede ser al menos de aproximadamente 10 mm, 11 mm o 12 mm. El diámetro promedio del tallo de un híbrido triploide *de arbusto* de acuerdo con la invención es, por lo tanto, de preferentemente al menos 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces o 1,6 veces el diámetro promedio del tallo de un híbrido triploide *no de arbusto* (tipo de crecimiento normal), que comprende el alelo *B*.

El alelo recesivo *de arbusto* puede transferirse a cualquier otra planta de sandía, por ejemplo, realizando cruces con plantas cultivadas a partir de las semillas depositadas, o regenerando plantas a partir de tejidos o cultivos celulares de las plantas cuyas semillas se han depositado y realizando cruces con dichas plantas regeneradas, o identificando plantas de sandía diploides que comprenden el alelo *de arbusto* (por ejemplo, plantas que pueden no mostrar el tipo de crecimiento *de arbusto* porque también contienen el alelo *B*). Así, las otras plantas de sandía a las que se puede transferir el alelo *b* son, por ejemplo, plantas que carecen del alelo *b* recesivo. Así, para transferir el alelo *de arbusto*, una planta de sandía que comprende el alelo *de arbusto* se cruza con otra planta de sandía que, por ejemplo, carece del alelo *b* y la F1 se autofecunda para producir una F2 o una generación posterior. La progenie F2 o de generaciones

posteriores que contiene el alelo de *arbusto* en forma homocigota en los diploides (o en tres o cuatro copias en los triploides o tetraploides) muestra el hábito de crecimiento de *arbusto* y, por lo tanto, puede identificarse fácilmente.

Para comprobar si otra planta de sandía tiene un alelo de *arbusto* o no, se puede realizar una prueba de alelismo.

5 Para determinar y/o seleccionar las líneas de plantas que tienen las características de crecimiento de *arbusto* como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, cuando se transfiere el alelo de *arbusto* a otras plantas de sandía que carecen del alelo recesivo de *arbusto*), se entiende que se cultivan varias plantas de una línea en uno o más lugares bajo las mismas condiciones ambientales, incluyendo variedades o líneas de control adecuadas, y se realizan mediciones en una pluralidad de plantas de una línea (al menos 3, preferentemente al menos 5 o 10 o más plantas) para poder calcular un valor promedio.

10 Las características del fruto no se ven influidas por la presencia de tres copias del alelo de *arbusto* (ausencia del alelo *B*), de modo que pueden producirse híbridos triploides con cualquier tamaño de fruta, cualquier forma de fruta, color y patrón de corteza de fruta cruzando el alelo de *arbusto* en entornos genéticos con diferentes características de fruta. El alelo de *arbusto* puede, por ejemplo, retrocruzarse en diferentes orígenes genéticos utilizando la semilla depositada en la presente memoria como fuente del alelo de *arbusto*, como se describe en otra parte de la presente memoria. Alternativamente, los genes que determinan las diferentes características del fruto pueden retrocruzarse en plantas que comprenden el tipo de crecimiento de *arbusto*. Por lo tanto, el peso promedio de los frutos de un híbrido triploide que comprende el tipo de crecimiento de *arbusto* puede ser de al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 kg. En otra realización, el peso promedio de los frutos de un híbrido triploide que comprende el tipo de crecimiento de *arbusto* puede ser menor que 5 kg, por ejemplo, 4, 3, 2, 1,5 o 1 kg. Para producir híbridos triploides con esos frutos pequeños se puede, por ejemplo, introducir el alelo de *arbusto* en variedades tal como Liliput, Extazy o Fantazy (Hazera) o Valdoria F1, Vanessa F1, Pixie F1 o Bonny F1 (Nunhems) o, a la inversa, los genes que determinan el tamaño de los frutos pequeños pueden retrocruzarse en plantas depositadas en la presente, con un tipo de crecimiento de *arbusto*.

25 Asimismo, cualquier otra característica del fruto puede combinarse con el tipo de crecimiento de *arbusto* mediante la cría. Como se ha mencionado, por ejemplo, la forma del fruto (por ejemplo, alargada, ovalada, en bloque, esférica o redonda), la superficie del fruto (surcada, lisa), el color de la pulpa (rojo escarlata, rojo coral, naranja, salmón, amarillo, amarillo canario o blanco), el color de la corteza (por ejemplo, verde claro; verde oscuro; con rayas verdes estrechas, medianas o anchas; tipos de gris; con o sin manchas; amarillo dorado), el espesor de la corteza, la dureza de la corteza, el patrón de la corteza (por ejemplo, con rayas, sin rayas, con red), el brix (estructura total de la pulpa / firmeza de la pulpa), por ej., rayada, no rayada, con red), brix (sólidos solubles totales), estructura de la pulpa / firmeza de la pulpa, mayor contenido de licopeno y/o vitaminas, diferentes proporciones de azúcar: ácido, muy buen sabor del fruto, etc., pueden modificarse mediante la cría. Véase Guner and Wehner 2004, Hort Science 39(6): 1175-1182, en particular las páginas 1180-1181 que describen los genes de las características del fruto. Los objetivos de mejora generalmente importantes son la madurez temprana, el alto rendimiento del fruto, la alta calidad interna del fruto (buen color uniforme, alto nivel de azúcar, relación adecuada entre azúcar y acidez, buen sabor, alto contenido de vitaminas y licopeno, textura de la pulpa firme, textura de la pulpa no fibrosa, ausencia de defectos tales como corazón hueco, necrosis de la corteza, podredumbre del extremo de la flor o punto de cruz y buenas características de la corteza y resistencia al agrietamiento).

40 En una realización de la invención, los frutos preferentemente no tienen una "corteza quebradiza" y/o una "corteza explosiva" como se describe en el documento WO03/075641 en la página 13 y 14, es decir, los frutos no se rompen bajo presión en el intervalo de 90 a 140 g/mm².

45 El alelo de *arbusto* puede introducirse en otras plantas de sandía que carezcan del alelo de *arbusto* utilizando procedimientos de reproducción conocidos. Se pueden utilizar procedimientos de reproducción conocidos, solos o combinados, como (pero no limitados a) la selección recurrente, la reproducción por pedigrí, la reproducción por retrocruzamiento, el desarrollo endogámico, la prueba de híbridos, la reproducción asistida por marcadores, etc. A continuación, se selecciona la progenie que conserva el hábito de crecimiento de *arbusto*, que puede identificarse fácilmente desde el punto de vista fenotípico. Por lo tanto, la selección de las plantas de la progenie que tienen el hábito de crecimiento de *arbusto* puede hacerse mediante la selección fenotípica de las características del hábito de crecimiento de *arbusto* y descartando las plantas que no tienen las características del hábito de crecimiento de *arbusto*, por ejemplo, que tienen vides principales más largas, entrenudos más largos y hojas más pequeñas en comparación con una planta de *arbusto* de acuerdo con la invención.

55 Por lo tanto, en un aspecto se proporciona una planta de la especie *Citrullus lanatus*, en la que dicha planta es triploide y tiene un hábito de crecimiento de *arbusto*, y comprende tres copias de un alelo recesivo designado como *arbusto*, en el que el alelo de *arbusto* se obtiene (puede obtenerse) cruzando una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB41906 o NCIMB41905, o la progenie de cualquiera de estas plantas (por ejemplo, obtenida por autofecundación y/o cruce y cuya progenie conserva el alelo de *arbusto* y/o el hábito de crecimiento de *arbusto*) con otra planta de sandía, por ej., obtenida por autofecundación y/o cruce y cuya progenie conserva el alelo de *arbusto* y/o el hábito de crecimiento de *arbusto*, con otra planta de sandía.

En un aspecto, la planta triploide que tiene un hábito de crecimiento de arbusto se obtiene cruzando una planta diploide de sandía en forma *de arbusto* con una planta tetraploide de sandía *en forma de arbusto*, en la que el alelo *de arbusto* se obtiene (puede obtenerse) cruzando una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB41906 o NCIMB41905, o la progenie de cualquiera de estas plantas (por ejemplo, obtenida por autofecundación y/o cruzamiento) con otra planta de sandía, por ej., obtenida por autofecundación y/o cruce y cuya progenie conserva el alelo *de arbusto* y/o el hábito de crecimiento *de arbusto*), con otra planta de sandía.

En un aspecto se proporciona una planta de la especie *Citrullus lanatus*, en la que dicha planta es triploide y tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*, y comprende tres copias de un alelo recesivo designado *de arbusto*, en la que la planta se puede obtener por (puede obtenerse por) propagación vegetativa de células vegetales o tejido vegetal de una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB 41907.

Como el alelo *b* es recesivo, el hábito de crecimiento *de arbusto* sólo se observa si no está presente el alelo *B* dominante. Cuando se transfiere el alelo *b* de un depósito de semillas diploides fabricado en la presente memoria (por ejemplo, NCIMB 41906 o su progenie) a otra planta de sandía que no contiene el alelo *b* recesivo, la F1 será heterocigota y no mostrará el hábito de crecimiento *en forma de arbusto* y el obtentor necesita primero hacer un autocontrol de F1 para identificar las plantas que comprenden el hábito de crecimiento *de arbusto*. Del mismo modo, cuando se transfiere el alelo *b* de una planta de sandía tetraploide (*bbbb*), como la cultivada a partir de semillas de NCIMB41905 o su progenie, a otra planta de sandía tetraploide que no comprende el alelo *b* recesivo, F1 será heterocigota y no mostrará el hábito de crecimiento *de arbusto* y, nuevamente, el fenotipo *de arbusto* sólo se verá en la generación F2. También se puede regenerar una planta *de arbusto* diploide a partir de las células haploides de una planta *de arbusto* tetraploide (por ejemplo, mediante el cultivo de polen o de anteras y la regeneración de una planta) y la planta *de arbusto* diploide derivada puede entonces utilizarse en la reproducción posterior y en la generación de plantas de sandía con un hábito de crecimiento *de arbusto*. Se trata de una planta tetraploide haploide con hábito de crecimiento *de arbusto*. Estas plantas están incluidas en la presente memoria.

Alternativamente, pueden desarrollarse marcadores moleculares vinculados al alelo *b* y, a continuación, la selección del hábito de crecimiento *de arbusto* puede realizarse seleccionando las plantas con los marcadores moleculares vinculados. Los marcadores vinculados pueden desarrollarse utilizando una serie de técnicas, tal como el análisis de segregantes a granel, y una serie de marcadores, como los marcadores AFLP, los marcadores RFLP, los marcadores SNP, los marcadores mini o micro satélites, etc. Para el desarrollo de marcadores, debe generarse una población segregante, por ejemplo, cruzando una planta con un tipo de crecimiento *de arbusto* (por ejemplo, una *bb* diploide) con una planta con un tipo de crecimiento normal (por ejemplo, una *BB* diploide) y desarrollando una población segregante a partir de esta (por ejemplo, una población F2 o F3 o una población retrocruzada). A continuación, se pueden identificar los marcadores que están estrechamente asociados (vinculados) con el hábito de crecimiento *de arbusto* y el alelo *de arbusto*, es decir, co-segregados con el alelo *b*. Véase, por ejemplo Wolukau *et al.* (HortScience February 2009 vol. 44 no. 1 32-34). El uso del análisis de segregantes a granel en el melón para identificar marcadores vinculados a un gen de resistencia. Un marcador molecular es una secuencia de ADN o un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) que se encuentra en el cromosoma cerca del alelo *b* (por ejemplo, a una distancia genética de 5 cM o menor) y que es diferente de la secuencia de ADN o SNP que se encuentra cerca del alelo *B*. Así, en una realización, el alelo *b* puede introducirse en otras plantas de sandía que carezcan del alelo *b* mediante procedimientos de reproducción asistida por marcadores, utilizando un marcador molecular estrechamente vinculado al alelo *b*.

Para la producción de frutos sin semilla, el híbrido *de arbusto* triploide de acuerdo con la invención puede intercalarse con un polinizador diploide adecuado, tal como, por ejemplo Jenny F1 (Nunhems) o Polimax F1 (Nunhems) u otros polinizadores, tal como SP-1, SP-2, SP-3, SP-4 o SP-5 (Syngenta) o Sidekick. A continuación, se recogen los frutos de las plantas triploides de la invención. Como las plantas triploides tienen un diámetro de planta más pequeño, es posible una mayor densidad de siembra o plantación en comparación con los triploides de crecimiento normal (como las plantas que tienen una longitud de vid principal superior a 200, 250 o 300 cm). De este modo también se consigue un mayor rendimiento de fruta triploide por hectárea.

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

- a) interplantar plantas *de arbusto* híbridas triploides y plantas polinizadoras diploides, en las que las plantas triploides se encuentran a una densidad que es de al menos 1,5 veces la densidad de plantación de las plantas híbridas triploides de crecimiento normal,
- b) permitir la polinización de las flores femeninas de las plantas *de arbusto* triploides, y
- c) cosechar los frutos de las plantas *de arbusto* híbridas triploides.

La densidad de las plantas de arbusto triploides en la etapa a) depende de si las plantas se cultivan en invernadero o en campo abierto y de si los triploides se injertan en portainjertos o no. Así, la densidad de plantas de arbusto triploides en el invernadero es preferentemente de al menos aproximadamente 7500 plantas por hectárea (triploides injertados) o 15000 plantas por hectárea (triploides no injertados). La densidad de plantas de arbusto triploides en el campo abierto es preferentemente de al menos aproximadamente 6000, 7000 u 8000 plantas por hectárea (triploides

injertados) o de al menos aproximadamente 12000, 13000, 14000 o 15000 plantas por hectárea (triploides no injertados).

El rendimiento de frutos triploides en la etapa c) es de al menos 1,25 veces el rendimiento de frutos triploides del tipo de crecimiento normal, tal como Boston F1 o Fashion F1. Así, en el campo abierto (no injertado) se cosechan al menos aproximadamente 75 toneladas de frutos triploides sin semillas (que comprenden tres copias del alelo *b*) por hectárea en la etapa c), preferentemente incluso al menos aproximadamente 80, 85 o 90 toneladas por hectárea. Así, en una realización, el procedimiento comprende la etapa d) cosechar al menos 75 toneladas por hectárea de frutos triploides. A continuación, se pueden clasificar, empacar en recipientes, etc. Los recipientes que comprenden o consisten en frutos triploides, preferentemente comercializables, que comprenden el alelo *b* son también una realización de la invención.

También se proporcionan semillas a partir de las cuales se pueden cultivar plantas híbridas triploides con un tipo de crecimiento *de arbusto*. Así, en una realización, se proporciona una semilla de sandía a partir de la cual se puede cultivar una planta *de arbusto* triploide como la descrita anteriormente. La semilla contiene tres copias del alelo *b*. En una realización, una muestra representativa de semillas se ha depositado con el número de acceso NCIMB 41907. En una realización, las semillas maduras son pequeñas, con un tamaño promedio de semilla igual o menor que 5 mm de longitud. Los empaques (bolsas, recipientes, etc.) que comprenden una pluralidad de tales semillas están comprendidos en la presente memoria.

También se incluyen en la presente memoria las plántulas, los vástagos y los portainjertos, así como las células y los tejidos, y los cultivos de células y de tejidos, y las propagaciones vegetativas de las plantas híbridas triploides que tienen un tipo de crecimiento *de arbusto*. Así, se proporcionan plantas enteras obtenidas a partir de plántulas, vástagos y portainjertos, así como células y tejidos, cultivos celulares y cultivos de tejidos y propagaciones vegetativas de las plantas híbridas triploides que conservan el tipo de crecimiento *de arbusto* de acuerdo con la invención cuando se regeneran en una planta y se cultivan en las mismas condiciones ambientales.

Asimismo, los frutos triploides sin semillas (*bbb*) cosechados de una planta *de arbusto* triploide de acuerdo con la invención se engloban en la presente memoria. Los frutos pueden cosecharse para su consumo en fresco o para su transformación. Los recipientes que comprenden o consisten en una pluralidad de tales frutas son una realización adicional de la invención. Preferentemente, los recipientes comprenden frutas comercializables.

La planta híbrida triploide que tiene un tipo de crecimiento *de arbusto* (*bbb*) es un híbrido F1 producido a partir de un cruce entre una línea parental masculina consanguínea diploide, que tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*, y una línea parental consanguínea tetraploide, que tiene un hábito de crecimiento *de arbusto* (véase la Figura 1). Por lo tanto, para producir semillas de plantas híbridas triploides con un tipo de crecimiento *de arbusto* (*bbb*) se puede propagar vegetativamente la planta híbrida triploide o, alternativamente, se pueden producir líneas parentales *de arbusto* diploides endogámicas (*bb*) y tetraploides endogámicas *de arbusto* (*bbbb*). Los expertos en la técnica pueden, por lo tanto, introducir diferentes características (tales como varios tamaños de frutos, etc.) en un híbrido *de arbusto* triploide generando primero progenitores masculinos y femeninos con diferentes características, pero conservando el tipo de crecimiento *de arbusto* como se describe en la presente memoria.

Un híbrido triploide de propagación vegetativa que tiene un hábito de crecimiento *de arbusto* es también una realización de la invención. En un aspecto, la planta de sandía tiene el alelo *de arbusto* como se encuentra en las semillas depositadas bajo NCIMB41907, NCIMB41906 o NCIMB41905. En un aspecto, el híbrido de propagación vegetativa se obtiene a partir de (obtenible de) tejido vegetal de NCIMB 41907.

Como se ha mencionado anteriormente, el alelo *b* puede transferirse desde los depósitos de semillas proporcionados en la presente memoria a otras plantas de sandía y, de este modo, pueden hacerse otros diploides *de arbusto* endogámico y/u otros tetraploides *de arbusto* endogámico. En una realización se proporciona una planta *de arbusto* diploide endogámico y/o una planta *de arbusto* tetraploide endogámico que comprende el alelo *b* tal como se encuentra en las semillas depositadas bajo los números de acceso NCIMB 41905, NCIMB 41906 y/o NCIMB 41907.

Cuando se hace referencia a una planta de sandía diploide o tetraploide con un hábito de crecimiento *de arbusto*, se entiende que se hace referencia a las mismas características de hábito de crecimiento *de arbusto* descritas anteriormente para el híbrido triploide *de arbusto*, es decir la planta *de arbusto* diploide o tetraploide tiene, debido a la presencia del alelo recesivo *de arbusto* "*b*" en dos o cuatro copias (y la ausencia del alelo dominante *B*), una longitud de vid más larga no superior a aproximadamente 150 cm, 140 cm o 100 cm, por lo que el diámetro promedio de la planta es de aproximadamente 300 cm, 280 cm o 200 cm o menos y una longitud promedio de entrenudos en la vid más larga de aproximadamente 7 cm o menos, pero al menos de aproximadamente 47 cm, preferentemente al menos aproximadamente 5,0, 5,5, 6,0 o 6,5 cm. El alelo recesivo *de arbusto* no afecta al tamaño de la hoja, de modo que la planta de acuerdo con la invención comprende hojas de tamaño similar al encontrado en diploides de tipo de crecimiento normal (tal como la variedad Milady) o tetraploides de tipo de crecimiento normal, es decir, de al menos aproximadamente 11 cm de longitud y/o al menos aproximadamente 15 cm de ancho, abarcando longitudes de hoja de al menos aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 cm y/o anchuras de hoja de al menos aproximadamente 15, 16, 17, 18 o 19 cm. Asimismo, la relación entre la longitud (promedio) de la vid más larga y el número (promedio) de entrenudos de la vid más larga es de 7 o menos. En otro aspecto, el *arbusto* diploide o el *arbusto* tetraploide no tiene

- más de (en promedio) 25, 21 o 15 entrenudos en la vid más larga. Asimismo, el diámetro (promedio) del tallo, medido en el centro de la vid más larga, es en un aspecto mayor que en los diploides o tetraploides de tipo de crecimiento normal, por ejemplo, el diámetro del tallo es al menos de aproximadamente 8 mm, preferentemente al menos de aproximadamente 9 mm e incluso puede ser al menos de aproximadamente 10 mm, 11 mm o 12 mm. El diámetro promedio del tallo de una planta de *arbusto* diploide o tetraploide de acuerdo con la invención es, por tanto, preferentemente al menos 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces 1,5 veces o 1,6 veces el diámetro promedio del tallo de un diploide o tetraploide *no de arbusto*, que comprende el alelo *B*. Las características del fruto (por ejemplo, el tamaño promedio del fruto, el peso, etc.) no difieren, en una realización, de las de los diploides o tetraploides de crecimiento normal.
- 5 Se puede realizar una línea endogámica de *arbusto* diploide en la que el alelo *de arbusto* (*b*) se derive, por ejemplo, del depósito de semillas realizado con el número de acceso NCIMB 41906 o de su progenie, por ejemplo, la progenie obtenida por autofecundación y/o cruce de NCIMB41906 con otra planta de sandía. Esto puede hacerse, por ejemplo, por cruce con NCIMB 41906, o su progenie, y selección en las generaciones de la progenie el tipo de crecimiento *de arbusto*, mientras se descartan las plantas que no tienen el tipo de crecimiento *de arbusto*. El alelo *de arbusto* también puede derivarse de otras plantas o partes de plantas que comprendan el alelo *de arbusto*, por ejemplo, el polen o los ovarios de una planta tetraploide *de arbusto*, como las semillas depositadas en el NCIMB 41905.
- 10 Alternativamente, se pueden realizar nuevas líneas endogámicas de *arbusto* diploides identificando variedades o líneas diploides que pueden comprender un alelo *de arbusto* aunque no tengan un tipo de crecimiento *de arbusto* (debido a que el alelo *B* dominante está presente). Por ejemplo, se pueden utilizar diploides que se sospecha que pueden contener un alelo *b*. Se puede realizar una prueba de alelismo para determinar si está presente un alelo recesivo *de arbusto*. Preferentemente, el diploide se autopoliniza durante una o más generaciones y se identifica un diploide que es homocigoto para el alelo *de arbusto* seleccionando las plantas de la progenie que tienen el tipo de crecimiento *de arbusto* determinado por el alelo *de arbusto* en forma homocigota. Las variedades que pueden ser adecuadas son Garden Baby, Bush Charleston Gray y Bush Sugar Baby o Sugar Bush.
- 20 Se puede realizar una línea endogámica tetraploide de *arbusto* en la que el alelo *de arbusto* se derive, por ejemplo, del depósito de semillas realizado con el número de acceso NCIMB 41905 o NCIMB 41906, o de la progenie de cualquiera de estos. Esto puede hacerse, por ejemplo, por cruce con NCIMB 41905 y/o NCIMB 41906, o su progenie, y selección en las generaciones de la progenie del tipo de crecimiento *de arbusto*, mientras se descartan las plantas que no tienen el tipo de crecimiento *de arbusto*. Cuando se utilice el NCIMB 41906, o su progenie, pueden emplearse técnicas de duplicación cromosómica para generar tetraploides, seguidas de la selección del hábito de crecimiento *de arbusto* en los tetraploides y en la progenie de los tetraploides obtenida mediante la autofecundación de los tetraploides seleccionados y la estabilización del hábito de crecimiento *de arbusto* en generaciones posteriores.
- 25 Como alternativa, se pueden crear nuevas líneas endogámicas de *arbusto* tetraploides a partir de nuevas plantas de *arbusto* diploides como se ha descrito anteriormente y llevar a cabo la endogamia de dichas plantas durante varias generaciones, seleccionando al mismo tiempo el tipo de crecimiento *de arbusto* como se define en la presente memoria, y duplicando el cromosoma de una línea endogámica de *arbusto* seleccionada para generar una línea de *arbusto* tetraploides. A continuación, la línea tetraploide se reproduce durante varias generaciones, seleccionando el tipo de crecimiento *de arbustos* como se describe en la presente memoria.
- 30 En un aspecto, la invención también proporciona una planta (o semilla) de la especie *Citrullus lanatus* en la que dicha planta es tetraploide y tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*. El hábito de crecimiento *de arbusto* se debe a la presencia del alelo *b*, por lo que se proporciona una planta tetraploide que tiene un hábito de crecimiento *de arbusto* y que comprende cuatro copias de un alelo recesivo designado *de arbusto*, en la que una muestra representativa de semilla que contiene dicho alelo *b* se ha depositado con el número de acceso NCIMB 41905. También se incluyen en la presente memoria todas las partes vegetales y la progenie de una planta *de arbusto* tetraploide, tal como las propagaciones vegetativas, las propagaciones de semillas (por ejemplo, las autofecundaciones) y también los cultivos de células o tejidos *in vitro*, así como el polen, los ovarios, etc. Así, en una realización, la planta tetraploide *de arbusto*, o las semillas a partir de las cuales se puede cultivar la planta, o el tejido o las partes vegetales (polen, anteras, óvulos) comprenden el alelo *b* tal como se encuentra en NCIMB 41905.
- 35 Así, en un aspecto se proporciona una planta de la especie *Citrullus lanatus*, en la que dicha planta es tetraploide y tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*, y comprende cuatro copias de un alelo recesivo designado *de arbusto*, en la que el alelo *de arbusto* se obtiene (puede obtenerse) cruzando una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB41906 o NCIMB41905, o la progenie de cualquiera de estas plantas (por ejemplo, obtenida por autofecundación y/o cruce) con otra planta de sandía.
- 40 En otro aspecto, se proporciona una planta de la especie *Citrullus lanatus*, en la que dicha planta es tetraploide y tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*, y comprende cuatro copias de un alelo recesivo designado *de arbusto*, en la que la planta se obtiene por autofecundación de una planta tetraploide de la que se depositó una muestra representativa de semillas con el número de acceso NCIMB 41905.
- 45
- 50
- 55

Una planta de sandía tetraploide propagada vegetativamente con un hábito de crecimiento *de arbusto* es también una realización de la invención. En un aspecto, la planta de sandía tiene el alelo *de arbusto* como se encuentra en las

semillas depositadas bajo NCIMB41907, NCIMB41906 o NCIMB41905. En un aspecto, la planta de sandía de propagación vegetativa se obtiene a partir de (es obtenible a partir de) células vegetales o tejido vegetal de NCIMB 41905.

5 En un aspecto, se proporciona una planta de la especie *Citrullus lanatus*, en la que dicha planta es tetraploide y tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*, y comprende cuatro copias de un alelo recesivo designado *de arbusto*, en la que la planta se puede obtener por (puede obtenerse por) propagación vegetativa de células o tejidos vegetales de una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB41905.

10 En otra realización, la planta *de arbusto* tetraploide comprende un alelo *b* identificado a partir de otras fuentes diploides como se ha descrito anteriormente o como se encuentra en las semillas depositadas bajo el número de acceso NCIMB 41906.

Se proporciona un procedimiento de generación de una planta endogámica tetraploide con un tipo de crecimiento *de arbusto*, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una planta diploide que comprende el alelo *b*,
- 15 b) autofecundar dicha planta diploide durante varias generaciones para generar una línea endogámica con un tipo de crecimiento *de arbusto*,
- c) duplicar los cromosomas de dicha línea endogámica para generar una línea tetraploide,
- d) autofecundar la línea tetraploide durante varias generaciones.

20 Así, en la etapa a) la planta diploide puede ser una planta derivada de la semilla depositada bajo NCIMB 41906 o su progenie, o puede ser una planta diploide a la que se ha transferido el alelo *b* del depósito de semillas NCIMB 41906 mediante el cruce y la selección del tipo de crecimiento *de arbusto*. El diploide también puede ser una nueva planta diploide en la que se ha identificado el alelo *b*, por ejemplo, utilizando una prueba de alelismo y/o identificando un diploide que pueda comprender el alelo *b*, autofecundando dicha planta durante una o más generaciones y seleccionando una planta progenitora con fenotípicamente el tipo de crecimiento *de arbusto*. Alternativamente, el diploide puede ser una planta haploide generada a partir de una semilla depositada bajo NCIMB 41905.

25 También se proporciona el uso de la planta *de arbusto* tetraploide de acuerdo con la invención como progenitor masculino o femenino, por lo que la planta *de arbusto* tetraploide se cruza con otra planta de sandía o se deja autofecundar para producir progenie. En una realización, la planta tetraploide *de arbusto* comprende un tipo de crecimiento *de arbusto*, debido a la presencia de cuatro copias del alelo *b*, en la que la planta *de arbusto* (y/o el alelo *b*) se puede obtener a partir de semillas depositadas bajo NCIMB 41905, o de su progenie.

30 Además, se proporciona el uso de la planta *de arbusto* tetraploide como progenitor femenino, especialmente como progenitor femenino en la producción de semillas de sandía híbrida triploide (es decir, la producción de semillas F1). Así, en un aspecto, las flores femeninas de la planta *de arbusto* tetraploide se polinizan (o se dejan polinizar) con polen de otra planta de sandía. La otra planta de sandía puede ser cualquier planta de sandía, por ejemplo, una planta de sandía diploide o tetraploide. En una realización específica, la otra planta de sandía es una planta diploide, preferentemente una planta diploide que comprende un tipo de crecimiento *de arbusto*. La planta de sandía diploide que comprende un tipo de crecimiento *de arbusto* puede ser cualquier planta diploide *de arbusto* como se ha descrito anteriormente, o una planta obtenible a partir de semillas depositadas bajo NCIMB 41906, o su progenie.

40 También se describe en la presente memoria un procedimiento de producción de semillas de sandías híbridas triploides, en el que las plantas triploides cultivadas a partir de dichas semillas tienen un hábito de crecimiento *de arbusto*, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) proporcionar una planta de sandía diploide con un hábito de crecimiento *de arbusto* y una planta tetraploide con un hábito de crecimiento *de arbusto*,
- b) permitir la polinización de las flores pistiladas de la planta *de arbusto* tetraploide con el polen de la planta *de arbusto* diploide, y
- 45 c) cosechar las semillas producidas en los frutos de la planta *de arbusto* tetraploide, y opcionalmente
- d) secar las semillas cosechadas.

Opcionalmente, las semillas F1 secadas y cosechadas se empacan. También pueden tratarse antes del empaclado. Por lo tanto, los empaques o recipientes que comprenden o consisten en semillas obtenidas por el procedimiento anterior son una realización de la presente memoria.

50 Este procedimiento también se ilustra en la Figura 1. La planta *de arbusto* tetraploide y la planta *de arbusto* diploide pueden proporcionarse como se describe en la presente memoria. Se pueden intercalar para permitir la polinización. Por lo tanto, en la etapa a) se plantan las semillas o las plántulas de ambas plantas y se cultivan una cerca de la otra.

Si la planta de *arbusto* diploide y la planta de *arbusto* tetraploide no florecen al mismo tiempo, la planta que florece más tarde puede plantarse o sembrarse antes, para que la floración se produzca más o menos al mismo tiempo. Dado que tanto las plantas diploides como las tetraploides tienen un hábito de crecimiento de *arbusto*, se pueden sembrar o plantar más plantas por hectárea en comparación con la producción de semillas de híbridos triploides con tetraploides de tipo de crecimiento normal. La polinización puede ser manual o mediante insectos (por ejemplo, abejas) en bloques de aislamiento. Para asegurar la polinización de las flores femeninas tetraploides con el polen del diploide masculino, se pueden utilizar diferentes procedimientos, como la recogida manual de las flores masculinas y la polinización manual de las flores femeninas, seguida de la cobertura de la flor polinizada. Alternativamente, todas las flores masculinas (estaminadas) que se desarrollen en las plantas tetraploides pueden ser eliminadas para asegurar la polinización de las flores pistiladas de las plantas de *arbusto* tetraploides con el polen diploide de las plantas de *arbusto* diploides. Cuando los frutos de las plantas tetraploides están maduros, se cosechan y se recogen las semillas híbridas F1 triploides (resultantes de la polinización cruzada). A continuación, pueden clasificarse (por ejemplo, por tamaño), secarse, opcionalmente tratarse y empacarse para su comercialización. En una realización, el progenitor femenino *tetraploide* (y/o el alelo *b*) se puede obtener a partir de semillas depositadas en NCIMB 41905 o de su progenie o propagación vegetativa. En otra realización, el progenitor macho diploide *del arbusto* (y/o el alelo *b*) se puede obtener a partir de semillas depositadas en NCIMB 41906 o de su progenie o propagación vegetativa.

Por lo tanto, se proporcionan también semillas obtenidas por el procedimiento anterior, es decir, semillas de híbridos F1 que, cuando se cultivan, producen plantas triploides que tienen un hábito de crecimiento de *arbusto*. Dichas semillas pueden ser empacadas en bolsas, recipientes y similares.

En una realización las semillas F1 son semillas de WH3451, una muestra representativa de semillas ha sido depositada bajo el número de acceso NCIMB 41907. En otra realización, el híbrido de *arbusto* triploide (y/o el alelo *b*) se puede obtener a partir de semillas depositadas bajo el NCIMB 41907 o de su progenie o de sus propagaciones vegetativas.

La planta tetraploide de *arbusto* utilizada en el procedimiento anterior comprende cuatro copias del alelo de *arbusto* (*bbbb*) en su genoma y tiene las siguientes características: una longitud de la vid más larga no mayor que 150 cm, preferentemente no más de 140 cm, 135 cm, o no más de 100 cm, una longitud promedio de los entrenudos en la vid más larga de 7 cm o menos pero de al menos 4,5 cm, y produce hojas de al menos 11 cm de longitud y/o al menos 15 cm de ancho.

También se proporciona un procedimiento para producir semilla de sandía de *arbusto* tetraploide, que comprende a) cultivar una planta de sandía de *arbusto* tetraploide según la presente invención, b) permitir la autopolinización de dicha planta de sandía tetraploide, c) obtener un fruto de una planta de la etapa b) y d) extraer la semilla tetraploide de dicho fruto. Preferentemente, el procedimiento comprende además el lavado y secado de dicha semilla. En una realización, la planta de sandía tetraploide de la etapa a) es una planta que comprende un tipo de crecimiento de *arbusto* como se describe en la presente memoria. En una realización, la planta puede comprender un alelo de *arbusto* obtenible a partir de semillas depositadas bajo los números de acceso NCIMB 41905, NCIMB 41906 o NCIMB 41907. La planta de la etapa a) puede obtenerse a partir de una planta, o de una parte de esta, cultivada a partir del número de acceso NCIMB 41905.

Como también se ha descrito con anterioridad, es una realización proporcionar un procedimiento de producción de fruta de sandía triploide sin semillas, comprendiendo dicho procedimiento:

1. proporcionar una planta de sandía híbrida triploide (F1) con un hábito de crecimiento de *arbusto*,
2. interplantar dichas plantas híbridas triploides con plantas polinizadoras diploides,
3. cosechar los frutos de sandía sin semillas producidos en las plantas triploides de (a).

La planta híbrida triploide de la etapa 1 no se injerta preferentemente en un portainjerto diferente. El procedimiento se lleva a cabo preferentemente en campo abierto.

El polinizador diploide de la etapa b) puede ser cualquier polinizador diploide, como un polinizador de tipo de crecimiento normal (*no de arbusto*), se pueden utilizar polinizadores comerciales tal como Jenny o Polimax, o Superpolinizadores (SP-1, SP-2, SP-3, SP-4, SP-5), Sidekick, Escort-4, Companion u otros. Opcionalmente, el polinizador puede ser un polinizador de doble propósito como se describe en el documento WO2012/069539 A1. El polinizador diploide debe producir suficiente polen en el momento adecuado del día y durante un período de tiempo apropiado para inducir la fructificación en los híbridos triploides. Las plantas polinizadoras pueden ser diploides híbridas (diploides F1) o polinizadoras abiertas (OP).

En este procedimiento se pueden cultivar por hectárea al menos 1,5 veces, preferentemente al menos 2 veces, 2,5 veces o 3 veces más plantas triploides de *arbusto* que cuando se utiliza una planta híbrida triploide que comprende un hábito de crecimiento normal (*no de arbusto*), tal como Boston F1. Se produce al menos un 15%, preferentemente un 20%, 30%, 40% o 50% más de frutos comercializables triploides por hectárea que cuando se utiliza una planta híbrida triploide con un hábito de crecimiento normal, como Boston F1. El rendimiento total de los frutos sin semilla cosechados de las plantas híbridas de *arbusto* triploides es preferentemente de al menos aproximadamente 75 toneladas por hectárea (t/ha), preferentemente de al menos 80 t/ha, más preferentemente de al menos 90 t/ha.

La interplantación en un campo puede realizarse mediante siembra o trasplante del polinizador y los triploides. Se pueden utilizar varios procedimientos de interplantación, tal y como se conoce en la técnica, y se pueden utilizar varias proporciones de polinizador : híbrido triploide. Una hilera de plantas polinizadoras puede estar presente, por ejemplo, al menos cada 2, al menos cada 3 o al menos cada 4 hileras de triploides, pero también pueden utilizarse otros procedimientos de interplantación.

La polinización suele realizarse mediante abejas, y pueden proporcionarse colmenas a los campos a menos que haya suficientes abejas silvestres de forma natural. La polinización también puede realizarse por medios manuales o mecánicos. La recolección en la madurez puede hacerse a mano o de forma mecanizada.

Los frutos triploides cosechados pueden ser empacados para su comercialización frescos o para su procesamiento. Los frutos que comprenden tres alelos *b* obtenibles por el procedimiento anterior están incluidos en la presente memoria. Estos frutos pueden distinguirse de los frutos de los híbridos triploides normales porque tienen la capacidad de producir plantas con un tipo de crecimiento *de arbusto* de acuerdo con la invención, es decir, tienen los determinantes genéticos que son responsables del tipo de crecimiento *de arbusto* (el alelo *b*). Si se desarrollan marcadores moleculares vinculados al alelo *b*, como se ha descrito anteriormente, el análisis de los marcadores puede distinguir fácilmente estos frutos. Alternativamente, las células o los tejidos de dichos frutos (o de otras partes vegetales de la que se cosechan) pueden cultivarse vegetativamente y regenerarse en plantas enteras, cuyas plantas regeneradas tienen el hábito de crecimiento *de arbusto*. Por lo tanto, en una realización, se proporcionan frutos triploides cosechados (*bbb*), tal como frutos enteros o partes de frutos empaquetados y/o frutos o partes de frutos procesados.

En otro aspecto de la invención se proporciona un cultivo celular o un cultivo de tejidos de células regenerables de una planta con un hábito de crecimiento *de arbusto* o que comprende un alelo *de arbusto*, todo como se ha descrito anteriormente. Un cultivo celular o un cultivo de tejidos comprende células o protoplastos o tejido vegetal de una parte de una planta que comprende un *arbusto-alelo* (como una planta tetraploide *de arbusto*, diploide *de arbusto* o triploide *de arbusto*, todas descritas en la presente memoria) seleccionada del grupo que consiste en: embriones, meristemos, cotiledones, polen, hojas, anteras, raíces, puntas de raíces, pistilos, flores, semillas, tallos. La parte vegetal puede seleccionarse entre un vástago, un fruto, un polen, un óvulo, un tallo, un cotiledón, una hoja, embriones celulares, meristemos, anteras, raíces, puntas de raíces, pistilos, flores y semillas. También se proporciona una planta de sandía regenerada a partir de dicho cultivo celular o de tejidos, en la que la planta regenerada (o su progenie, por ejemplo, obtenida tras la autofecundación) comprende un hábito de crecimiento *de arbusto*. Por lo tanto, en un aspecto, las plantas de sandía de propagación vegetativa obtenidas a partir de tejido vegetal de semillas o plantas cultivadas a partir de semillas depositadas bajo NCIMB 41907, NCIMB 41906 o NCIMB 41905 están comprendidas en la presente memoria.

Se entiende que también es objeto de la invención proporcionar semillas a partir de las cuales se puedan cultivar las plantas diploides, triploides o tetraploides *de arbusto* descritas en la presente memoria. También se engloban en la presente memoria las plántulas, los esquejes y los portainjertos, así como las células y los tejidos de las plantas diploides, triploides o tetraploides *de arbusto*. Estas partes vegetales comprenden los determinantes genéticos para producir plantas *de arbusto* de acuerdo con la invención. Así, las plantas enteras obtenidas a partir de plántulas, injertos y portainjertos, así como de células y tejidos de las plantas triploides o tetraploides *de arbusto*, conservan todas las características fisiológicas y morfológicas de las plantas triploides o tetraploides *de arbusto* de acuerdo con la invención cuando se cultivan en las mismas condiciones ambientales.

También se proporciona en la presente memoria la progenie de cualquiera de las plantas de acuerdo con la invención, como las semillas que se obtienen cruzando una planta que comprende el alelo *de arbusto* (y que carece del alelo *B*) descrito en la presente memoria con otra planta de sandía y/o autofecundando una planta de acuerdo con la invención para producir semillas F1, y la progenie de generaciones posteriores (F2, F3, etc.). La presencia del alelo *de arbusto* en la progenie puede determinarse por el tipo de crecimiento *de arbusto* (por ejemplo, en las líneas endogámicas) y/o el análisis de marcadores.

En una realización, se proporciona una planta de sandía tetraploide (y semillas a partir de las cuales se puede cultivar dicha planta) con un hábito de crecimiento *de arbusto*, en la que se proporciona una muestra representativa de semillas que contiene los elementos genéticos para dicho hábito de crecimiento *de arbusto* (es decir, que contienen el alelo *b* en cuatro copias, y no contienen el alelo *B*), en la que una muestra representativa de semillas se ha depositado con el número de acceso NCIMB 41905.

En una realización, se proporciona una planta de sandía triploide (y semillas a partir de las cuales se puede cultivar dicha planta) que tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*, en la que se proporciona una muestra representativa de semillas que contienen los elementos genéticos para dicho hábito de crecimiento *de arbusto* (es decir, que contienen el alelo *b* en tres copias, y no contienen el alelo *B*), en la que una muestra representativa de semillas se ha depositado bajo el número de acceso NCIMB 41907.

En una realización, se proporciona una planta de sandía diploide (y semillas a partir de las cuales se puede cultivar dicha planta) que tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*, en la que se proporciona una muestra representativa de semillas que contiene los elementos genéticos para dicho hábito de crecimiento *de arbusto* (es decir, que contiene el

alelo *b* en dos copias, y no contiene el alelo *B*), en la que una muestra representativa de semillas se ha depositado con el número de acceso NCIMB 41906.

Se proporcionan semillas de sandía que contienen el alelo recesivo designado "*arbusto*", en las que una muestra representativa de semillas que contienen dicho alelo "*arbusto*" se ha depositado bajo el número de acceso NCIMB 41905, NCIMB 41906 y NCIMB 41907. En una realización, las semillas tienen un pedigrí que incluye la línea endogámica WHAAOX o la línea endogámica WHAAPD como una de las líneas parentales. También se proporciona una planta de sandía producida por el cultivo de dichas semillas. También se proporciona el polen y los óvulos de la planta producidos por el cultivo de dichas semillas.

Las plantas de sandía obtenidas (derivadas), u obtenibles (derivables), a partir de plantas de acuerdo con la invención (por ejemplo, a partir de plantas que comprenden un hábito de crecimiento de *arbusto* y/o que comprenden los determinantes genéticos, el alelo *b*, que confiere el hábito de crecimiento de *arbusto*) incluyen plantas obtenidas por procedimientos de reproducción, tal como la autofecundación, el cruce, el retrocruzamiento, la selección recurrente, la producción de dobles haploides, la selección asistida por marcadores, las propagaciones clonales, los transformantes, etc., en el que las plantas derivadas comprenden un hábito de crecimiento *de arbusto* y/o los determinantes genéticos (alelo *b*) que confieren el hábito de crecimiento *de arbusto* (cuando el alelo *B* está ausente) de acuerdo con la invención.

En un aspecto se proporciona una planta de sandía, de la que se ha depositado un número representativo de semillas bajo el número de acceso NCIMB 41905, NCIMB 41906 y NCIMB 41907, o la progenie de cualquiera de estas plantas, por ejemplo, obtenida por cruce y/o autofecundación. En un aspecto se proporciona una semilla de sandía, de la cual un número representativo de semillas ha sido depositado bajo el número de acceso NCIMB 41905, NCIMB 41906 y NCIMB 41907.

También se proporciona polen, un óvulo, células, tejidos, propagaciones vegetativas obtenidas de estas plantas, o de su progenie. En un aspecto, la progenie conserva el alelo *de arbusto* y el hábito de crecimiento *de arbusto* de las plantas cuyas semillas se depositaron bajo NCIMB 41905, NCIMB 41906 y NCIMB 41907.

También se proporciona un fruto de una planta de sandía, en el que el fruto se produce por autopolinización de la planta. También se proporcionan frutos triploides sin semillas, en los que los frutos se obtienen por polinización de una planta cultivada a partir de una planta de sandía de la que se ha depositado un número representativo de semillas con el número de acceso NCIMB 41907.

También una semilla híbrida triploide obtenida mediante el cruce de una planta de sandía diploide, de la que se ha depositado un número representativo de semillas con el número de acceso NCIMB 41906, con una planta de sandía tetraploide, de la que se ha depositado un número representativo de semillas con el número de acceso NCIMB 41905.

También se proporciona un procedimiento de producción de frutos de sandía triploides sin semillas, que comprende la interplantación de semillas de una planta de sandía de *arbusto* triploide, cuyas semillas representativas fueron depositadas bajo el número de acceso NCIMB 41907 u otro *de arbusto* triploide de acuerdo con la invención, con una planta polinizadora diploide, permitiendo la polinización de dichas plantas de sandía triploides por el polen de dicha planta polinizadora diploide para obtener frutos triploides sin semillas en la planta triploide.

También se describe en la presente memoria un procedimiento de producción de una variedad de sandía triploide con un tipo de crecimiento *de arbusto*, comprendiendo dicho procedimiento a) proporcionar una línea de sandía *de arbusto* diploide, b) proporcionar una línea de sandía *de arbusto* tetraploide, y c) cruzar las líneas *de arbusto* diploide y tetraploide, y recoger las semillas triploides de dicho cruce. En un aspecto, la línea de sandía de *arbusto* diploide es la planta cuyas semillas representativas se depositaron con el número de acceso NCIMB41906, o su progenie, o sus propagaciones vegetativas. En otro aspecto, la línea de sandía tetraploide *de matorral* es la planta cuyas semillas representativas se depositaron con el número de acceso NCIMB41905, o su progenie, o sus propagaciones vegetativas.

LEYENDAS DE LA FIGURA

Figura 1

Diagrama esquemático de los procedimientos y plantas/frutos de acuerdo con la invención. Un macho *de arbusto* (*bb*) y una hembra *de arbusto* (*bbbb*) se cruzan para producir semillas de híbridos *de arbusto* triploides (*bbb*). Estas semillas F1 pueden intercalarse (en la hilera o entre las hileras) con cualquier polinizador diploide para producir frutos triploides sin semillas en las plantas de *arbusto* híbridos triploides.

Los siguientes Ejemplos no limitantes describen la producción de híbridos *de arbusto* triploides de acuerdo con la invención. A menos que se indique lo contrario en los Ejemplos, se utilizan procedimientos para la cría convencional de sandías, como los descritos, por ejemplo, en Maynard 2001, Watermelons - Characteristics, Production and Marketing, ASHS Press Mohr H.C. Watermelon Breeding en Mark J. Bassett (editor) 1986 Breeding Vegetable Crops, AVI Publishing Company.

INFORMACIÓN SOBRE DEPÓSITOS

El solicitante ha depositado el híbrido WH3451 el 1 de diciembre de 2011 en el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41907. Las semillas de WHAAPD y WHAAOX fueron depositadas por Nunhems B.V. el 1 de diciembre de 2011 en el NCIMB con los números de acceso NCIMB 41905 y NCIMB 41906, respectivamente. El acceso a los depósitos estará disponible durante la pendency de esta solicitud para las personas que el Comisario de Patentes y Marcas determine que tienen derecho a ello, previa solicitud.

Sujeto a 37 C.F.R. § 1.808(b), todas las restricciones impuestas por el depositante sobre la disponibilidad al público de uno o más depósitos serán eliminadas irrevocablemente al concederse la patente, permitiendo el acceso a un depósito de al menos 2500 semillas en NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, UK. El depósito se mantendrá durante un período de 30 años, o 5 años después de la última solicitud, o durante la vida ejecutiva de la patente, lo que sea más largo, y se sustituirá si alguna vez se vuelve inviable durante ese período. El solicitante no renuncia a ningún derecho concedido en virtud de esta patente en esta solicitud o en virtud de la Ley de Protección de Obtenciones Vegetales (7 USC 2321 et seq.).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de híbridos de *arbusto* triploides (bbb)

Se observó que una sandía diploide de jardín casero tenía un tipo de crecimiento interesante. A partir de esta observación se desarrolló un programa de cría para determinar la capacidad de herencia de este tipo de crecimiento y para fijar el tipo de crecimiento, a fin de poder generar híbridos triploides con este tipo de crecimiento. Se comprobó que el tipo de crecimiento era heredable como rasgo recesivo, y se denominó "alelo de *arbusto*" (*b*). Se ha comprobado que es responsable de la longitud de la vid, sin que esto afecte al tamaño de las hojas ni al de los frutos.

Para generar un híbrido de *arbusto* triploide, primero se generó una línea parental masculina de *arbusto* diploide endogámico y una línea parental femenina de *arbusto* tetraploide endogámico (véase la Fig. 1).

La generación del progenitor endogámico de *arbusto* se realizó seleccionando un diploide con el tipo de crecimiento observado, realizando una serie de cruces con dicho diploide y líneas propias y llevando a cabo la endogamia de la línea de *arbusto* diploide derivada durante nueve generaciones para fijar las características de *arbusto* en la línea diploide.

La generación de la línea endogámica tetraploide de *arbusto* hembra se llevó a cabo seleccionando una sandía diploide con el tipo de crecimiento observado, realizando una serie de cruces con dichas líneas diploides y propias y generando una línea endogámica de *arbusto* diploide mediante la autofecundación de una línea derivada durante más de nueve generaciones para obtener una línea de *arbusto* diploide uniforme (endogámica). La línea de *arbusto* diploide generada se trató entonces con colchicina para duplicar los cromosomas. Tras el tratamiento con colchicina se seleccionó una línea tetraploide y la línea se autofecundó durante varias generaciones para fijar las características de *arbusto* en la línea tetraploide. En cada generación de aumento de semillas de la línea tetraploide se comprobó el nivel de ploidía mediante citometría de flujo.

El *arbusto* femenino tetraploide endogámico (*bbbb*), designado WHAAPD, y el *arbusto* masculino diploide endogámico (*bb*), designado WHAAOX, se polinizaron de forma cruzada para producir frutos con semillas triploides (*bbb*), designados WH3451. Las semillas del híbrido triploide WH3451 fueron cosechadas de los frutos y depositadas por Nunhems B.V. el 1 de diciembre de 2011 en el NCIMB con el número de acceso NCIMB 41907. Las semillas de WHAAPD y WHAAOX fueron depositadas por Nunhems B.V. el 1 de diciembre de 2011 en el NCIMB con los números de acceso NCIMB 41905 y NCIMB 41906, respectivamente.

Las características fisiológicas y morfológicas del híbrido de *arbusto* triploide WH3451 se analizaron en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 2 - Comparación de los híbridos de *arbusto* triploides WH3451 con los híbridos de la técnica anterior

2.1 - Materiales y procedimientos

Se realizó un ensayo de campo en Italia (Sant'Agata Bolognese-BO). Las semillas se sembraron el 7/04/2010 y se trasplantaron al campo el 20/05/2010 (100 cm dentro de la fila, 250 cm entre filas). La parcela contenía 10 plantas por línea.

El nivel de ploidía se determinó por citometría de flujo.

Se determinaron los valores medios para las siguientes características:

— La longitud y la anchura de las hojas se midieron en 1 hoja de 3 plantas por línea.

- Se contó el número de flores estaminadas de 3 plantas por línea en la fecha de floración. Se calculó el número promedio de 3 plantas.
- Se midió el diámetro promedio del tallo en la mitad del tallo principal de 3 plantas y se calculó la media.
- Madurez: el número de días desde la floración hasta la madurez se determinó registrando las fechas en las que el 50% de las plantas de la parcela mostraban al menos una flor femenina y, a continuación, cuando el 50% de las plantas de la parcela tenían frutos listos para la cosecha
- Tallo: número promedio de entrenudos: el número promedio de entrenudos de la vid más larga medido en 3 plantas por línea
- Tallo: longitud promedio de los entrenudos (cm): la longitud promedio de los entrenudos (cm) medida en la vid más larga de 3 plantas por línea
- Tallo: longitud promedio de la vid más larga (cm): longitud promedio de la vid más larga (cm) medida 3 plantas por línea
- Peso promedio de los frutos (kg): media del peso de 3 frutos por línea recogidos al azar de 3 plantas en la madurez
- Longitud promedio del fruto (cm): media de la longitud de 3 frutos
- Diámetro promedio del fruto en la sección media (cm): media del diámetro de 3 frutos
- Fruto: se midió el espesor de la corteza (cm) en el extremo de la flor y el espesor de la corteza en el lado del fruto para 3 frutos. El espesor de la corteza se mide desde el borde exterior del fruto hasta el límite entre el mesocarpo blanco y el endocarpo coloreado
- Fruto: grado Brix: el valor es la media de 1 lectura para 3 frutos, recogida entre el centro y la corteza del fruto; expresado en grados Brix (°) utilizando el refractómetro portátil K71901 Mod. RLC ATC 0-18% (OPTTECH)
- Tamaño de las semillas de siembra longitud (mm) y anchura (mm) media de la medida de 5 semillas
- Color: evaluado mediante la mini carta de colores de la Royal Horticultural Society (<http://www.rhs.org.uk/Plants/RHS-Publications/RHS-colour-charts>)

2.1 - Resultados

Tabla 1

	WH3451 (híbrido de <i>arbusto</i> triploide invención)	cv Milady Híbrido diploide - tipo de crecimiento normal	cv Fashion F1 Híbrido triploide - tipo de crecimiento normal	cv Boston F1 Híbrido triploide - tipo de crecimiento normal
Ploidía	3n	2n	3n	3n
Alelos de arbusto	<i>bbb</i>	<i>BB</i>	<i>BBB</i>	<i>BBB</i>
Lóbulos de hoja	lobulado	lobulado	lobulado	lobulado
Longitud de hoja (cm)	17,50	12,17	17,13	15,67
Anchura de hoja (cm)	19,50	15,50	17,97	16,30
Color de hoja (carta de colores RHS)	Verde oscuro RHS 137a	Verde oscuro RHS 137a	Verde oscuro RHS 137c	Verde oscuro RHS 137a
Número de flores estaminadas	6,00	15,50	s.f.	s.f.
Diámetro de vástago (mm)	9,00	7,00	6,25	5,50

	WH3451 (híbrido de <i>arbusto</i> triploide invención)	cv Milady Híbrido diploide - tipo de crecimiento normal	cv Fashion F1 Híbrido triploide - tipo de crecimiento normal	cv Boston F1 Híbrido triploide - tipo de crecimiento normal
Número de tallos principales en la corona	2,00	2,50	2,00	2,50
Hoja: Grado de lobulación de la hoja secundaria	4	4	4	5
1 = muy bueno				
9 = muy fuerte				
Madurez: número de días desde la floración hasta la madurez	27,00	29,00	29,00	32,00
Tallo: número promedio de entrenudos	13,57	31,36	25,95	36,53
Tallo: longitud promedio de entrenudos (cm)	7,00	11,00	11,00	9,00
Tallo: longitud promedio de la vid (cm)	95,00	345,00	279,00	321,00
Relación: longitud de la vid / número de entrenudos	7,00	11,00	11,00	9,00
Peso promedio de los frutos (kg)	5,7	11,40	7,30	6,80
Forma del fruto en sección longitudinal	Elíptica ancha (circular ancha)	Elíptica alargada	circular	circular
Longitud promedio del fruto (cm)	24,00	46,75	20,60	23,20
Diámetro promedio del fruto en la sección media (cm)	19,00	21,25	22,25	24,55
Índice de frutos: relación longitud/diámetro	1,26	2,20	0,93	0,95
Patrón de corteza de fruto	rayado	rayado	rayado	rayado
Fruto: anchura de las rayas	5	6	2	2
1 = muy estrecho				
9 = muy amplio				
Fruto: color base de la piel (carta de colores RHS)	Verde medio RHS 145b	Verde medio RHS145c	Verde oscuro RHS 136a	Verde claro RHS 2d

	WH3451 (híbrido de <i>arbusto</i> triploide - invención)	cv Milady Híbrido diploide - tipo de crecimiento normal	cv Fashion F1 Híbrido triploide - tipo de crecimiento normal	cv Boston F1 Híbrido triploide - tipo de crecimiento normal
Fruto: color de las rayas (carta de colores RHS)	Verde oscuro RHS 136a	Verde oscuro RHS 137a	Verde oscuro	Verde oscuro RHS 137c
Fruto: espesor de la corteza (cm) (extremo de la flor)	1,50	1,00	1,00	1,30
Fruto: espesor de la corteza (cm) (lado)	2,00	2,00	1,50	1,50
Fruto: color de la carne (carta de colores RHS)	Rojo oscuro RHS 44a	Rojo oscuro RHS 45a	Rojo oscuro RHS 44a	Rojo oscuro RHS 47a
Fruto: grado Brix	12,00	11,00	12,00	11,75
Tamaño de la semilla de siembra 1 = muy pequeña, 9 = muy grande	2	4	4	5
Tamaño de la semilla de siembra (mm)	5,00	8,00	7,00	8,00
Anchura de la semilla de siembra (mm)	3,00	5,00	5,00	5,00

Los progenitores masculinos (*bb*) y femeninos (*bbbb*) de *arbusto* tienen esencialmente las mismas características de tipo de crecimiento de *arbusto* que se indican para el híbrido triploide WH3451 en la Tabla 1 anterior.

Ejemplo 3 - Espacios reducidos para híbridos de *arbusto* triploide

- 5 Dado que los híbridos triploides de *arbusto* son plantas pequeñas, sin que por ello se reduzca el tamaño de los frutos y el rendimiento de los mismos por hectárea y sin que se reduzca el tamaño de las hojas (es decir, el tejido fotosintético), estas plantas pueden utilizarse para cultivar al menos aproximadamente 1,5 veces, preferentemente al menos aproximadamente 2 veces o 2,5 veces, preferentemente incluso aproximadamente 3 veces más plantas triploides por hectárea en comparación con los híbridos triploides de tipo normal, tal como Fashion F1 y Boston F1,
- 10 aumentando así el rendimiento de frutos comercializables por hectárea. Así, el rendimiento de fruta triploide por hectárea puede incrementarse significativamente utilizando las plantas de *arbusto* triploides de acuerdo con la invención, es decir, el rendimiento de fruta de las plantas de *arbusto* triploides puede ser al menos aproximadamente 1,25 veces o al menos aproximadamente 1,5 veces el rendimiento de un campo de producción triploide de tipo normal.

- 15 La siguiente Tabla 2 muestra el número de plantas por hectárea para las variedades triploides de tipo de crecimiento normal Fashion F1 y Boston F1 en comparación con las plantas de *arbusto* triploides de acuerdo con la invención, como WH3451:

	Invernadero injertado	Invernadero no injertado	Campo abierto injertado	Campo abierto no injertado
cv Fashion F1 o Boston F1	2500 plantas/ha	5000 plantas/ha	3000 plantas/ha	7000 plantas/ha
Híbrido de <i>arbusto</i> triploide	7500 plantas/ha	15000 plantas/ha	6000-8000 plantas/ha	12000 - 15000 plantas/ha

Los rendimientos de fruta de Fashion F1 y Boston F1 son de aproximadamente 60 toneladas/hectárea (t/ha) en campo abierto, en comparación con las 75-90 t/ha del híbrido triploide de *arbusto*.

Ejemplo 3

En 2012 se determinó el tipo de crecimiento vegetativo de los progenitores *de arbusto* macho (*bb*) y hembra (*bbbb*), cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

	NCIMB41905 (<i>arbusto</i> tetraploide)	NCIMB41906 (<i>arbusto</i> diploide)
Ploidía	4n	2n
Alelos de arbusto	<i>bbbb</i>	<i>bb</i>
Lóbulos de hoja	lobulado	lobulado
Longitud de hoja (cm)	13,00	14,00
Anchura de hoja (cm)	15,00	10,00
Color de hoja (carta de colores RHS)	Verde oscuro RHS 137c	Verde oscuro RHS 137c
Tallo: longitud promedio de los entrenudos (cm)	6,00	6,00
Tallo: longitud promedio de la vid (cm)	133,00	150,00
Relación: longitud de la vid / número de entrenudos	6,00	6,00

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta de la especie *Citrullus lanatus*, en la que dicha planta es triploide y tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*, que comprende tres copias de un alelo recesivo designado como *arbusto*, en la que dicho alelo *de arbusto* se obtiene cruzando una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB41906 o NCIMB41905 con otra planta de sandía.
- 10 2. La planta de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la planta es un híbrido F1 producido a partir de un cruce entre una línea parental masculina endogámica diploide, que tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*, y una línea parental endogámica tetraploide, que tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*.
- 15 3. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la planta tiene una longitud de vid más larga no mayor que 100 cm.
4. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha planta no tiene más de 15 entrenudos en la vid más larga.
5. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha planta tiene una longitud promedio de los entrenudos en la vid más larga de 7 cm o menos, pero de al menos 4,7 cm.
- 20 6. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la relación entre la longitud de la vid más larga y el número de entrenudos de la vid más larga es de 7 o menos.
7. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha planta tiene un diámetro de tallo de al menos 8 mm.
8. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha planta comprende hojas de al menos 10 cm de largo y al menos 15 cm de ancho.
9. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha planta produce frutos con un peso promedio de al menos 5 kg tras la polinización con polen diploide.
10. Semillas a partir de las cuales se puede cultivar una planta de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9.
- 25 11. Una planta o semilla de la especie *Citrullus lanatus* en la que dicha planta es tetraploide y tiene un hábito de crecimiento *de arbusto*, que comprende cuatro copias de un alelo recesivo designado como *arbusto*, en la que dicho alelo *de arbusto* se obtiene cruzando una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB41906 o NCIMB41905 con otra planta de sandía.
- 30 12. Un cultivo de tejidos de células regenerables de una planta de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
13. Un cultivo de tejidos de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende células o protoplastos o tejido vegetal de una parte vegetal seleccionada del grupo que consiste en: embriones, meristemos, cotiledones, polen, óvulos, hojas, anteras, raíces, puntas de raíces, pistilos, flores, semillas, tallo.
- 35 14. Una parte vegetal de la planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicha parte se selecciona de una púa, fruto, polen, óvulo, tallo, cotiledón, hoja, embriones celulares, meristemos, anteras, raíces, puntas de raíces, pistilos, flores, semillas.
15. Una planta de sandía regenerada a partir del cultivo de tejidos de la reivindicación 12 o 13, en la que la planta regenerada es un triploide o tetraploide y comprende un hábito de crecimiento *de arbusto*.
- 40 16. La planta de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicha planta tetraploide tiene las siguientes características: una longitud de vid más larga no mayor que 100 cm, una longitud promedio de los entrenudos en la vid más larga de 7 cm o menos pero de al menos 4,7 cm, y produce hojas de al menos 10 cm de longitud y al menos 15 cm de ancho.
17. Un procedimiento de producción de frutos de sandía triploides sin semillas, comprendiendo dicho procedimiento:
 - 45 a) proporcionar una planta de sandía híbrida triploide que comprende un hábito de crecimiento *de arbusto* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;
 - b) interplantar dichas plantas híbridas triploides con plantas polinizadoras diploides,
 - c) cosechar los frutos de sandía sin semillas producidos en las plantas triploides de (a).

- 5
18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que se cultivan al menos 1,5 veces más plantas *de arbusto* triploides por hectárea que cuando se utiliza una planta híbrida triploide que comprende un hábito de crecimiento normal, tal como Boston F1.
 19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, en el que se producen al menos un 15% más de frutos triploides por hectárea que cuando se utiliza una planta híbrida triploide que comprende un hábito de crecimiento normal, tal como Boston F1.

Figura 1

