

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 083**

51 Int. Cl.:

A01H 5/08 (2008.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

A01H 4/00 (2006.01)

A01H 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2016** **PCT/EP2016/073875**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2017** **WO17060350**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2016** **E 16778009 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024** **EP 3358943**

54 Título: **Plantas de sandía resistentes al virus del amarilleamiento de las venas del pepino (CVYV)**

30 Prioridad:

06.10.2015 EP 15188630

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

25.06.2024

73 Titular/es:

NUNHEMS B.V. (100.0%)

Napoleonsweg 152

6083 AB Nunhem, NL

72 Inventor/es:

DE GROOT, ERIK;

VAN DE WAL, MARION;

BERENTSEN, RICHARD BERNARD;

CHIAPPARINO, ELENA y

OGUNDIWIN, EBENEZER

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 974 083 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 resistentes al virus del amarilleamiento de las venas del pepino (CVYV)

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona con el campo de la reproducción y mejora de plantas. Se proporcionan plantas de sandía resistentes al virus del amarilleamiento de las venas del pepino (CVYV) y marcadores SNP (polimorfismo de nucleótido único) estrechamente vinculados al locus de resistencia al CVYV, tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas. Estos marcadores pueden utilizarse para seleccionar plantas de sandía, o partes de plantas, que comprendan el locus de resistencia al CVYV y sean resistentes al CVYV cuando el locus de resistencia esté en forma homocigota en una planta diploide, o en tres o cuatro copias en una triploide o tetraploide respectivamente. Los marcadores también pueden utilizarse para distinguir plantas (o partes de plantas de dichas plantas) que comprenden el locus de resistencia CVYV de plantas (o partes de plantas) que carecen del locus de resistencia CVYV. El locus de resistencia CVYV es un locus recesivo único. El locus está situado en el cromosoma 3 del genoma de la sandía. En el mismo cromosoma Ling et al. (Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth Eucarpia Meeting, May 21-24th) informó de un marcador en el gen *elF4E* vinculado a la resistencia al ZYMV (virus del mosaico amarillo del calabacín) conferida por un gen recesivo denominado *zym*. Las plantas cultivadas de sandía de la invención, que comprendían una introgresión homocigótica de sandía silvestre que confería resistencia al CVYV, no comprendían resistencia al ZYMV y no comprendían el marcador en el gen *elF4E* notificado por Ling et al. 2008 (supra). El locus de resistencia CVYV de la invención puede, por tanto, utilizarse solo, u opcionalmente puede combinarse con la resistencia ZYMV (el gen recesivo *zym*), para producir plantas doblemente resistentes. Las plantas de sandía de la invención, que comprenden un fragmento de introgresión en el cromosoma 3, son plantas cultivadas de *C. lanatus* ssp. *vulgaris* que producen frutos comercializables con un grado brix de al menos 8,0 o 9,0, preferentemente al menos 10,0, o al menos 11,0. Las plantas o partes de plantas comprenden así un genoma de sandía cultivada (*C. lanatus* ssp. *vulgaris*), que comprende un fragmento de introgresión de una sandía silvestre en el cromosoma 3, tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas (ya sea de una planta de la especie *C. lanatus* ssp. *lanatus* o de una planta de la especie *C. lanatus* ssp. *mucosospermus*), por lo que dicho fragmento de introgresión comprende el locus de resistencia al CVYV. El locus CVYV y/o el fragmento de introgresión pueden identificarse en las células, plantas, partes de plantas o ADN de las mismas mediante marcadores estrechamente ligados, es decir, mediante el genotipo SNP (o haplotipo SNP) de uno o más de los marcadores SNP proporcionados en el presente documento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

Se ha identificado resistencia contra CVYV en melón y pepino, pero aún no en sandía. Por ejemplo, el documento WO2010/025747 describe un QTL de resistencia contra el CVYV en melón, derivado de la variedad local Cuc6491. El documento WO2011003440 describe la resistencia al CVYV en el pepino.

Los síntomas de CVYV en sandía son a veces clorosis foliar leve, pero a menudo los síntomas externos son discretos o no se manifiestan. La infección por CVYV sólo se observa entonces cuando se detecta que los frutos han desarrollado una necrosis interna que no se ve desde el exterior, pero que hace que los frutos no sean aptos para el consumo.

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

Es un objeto de la invención proporcionar plantas cultivadas de sandía, *C. lanatus* ssp. *vulgaris*, y partes de dichas plantas, que comprenden un locus de resistencia en el cromosoma 3, que confiere resistencia contra el CVYV cuando está en forma homocigota en una planta diploide, o cuando está en tres o cuatro copias en una planta triploide o tetraploide respectivamente. Este locus es un Locus de Rasgo Cuantitativo (QTL) identificado en dos accesiones silvestres diferentes de *Citrullus lanatus* ssp. *lanatus* y *Citrullus lanatus* ssp. *mucosospermus*, que tienen frutos de pulpa blanca o amarilla que son de sabor amargo y tienen un brix muy bajo (por ejemplo, un brix de 3,0 o menos), y este locus se introgresó en sandías cultivadas (*Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*) que tienen frutos comercializables, es decir, frutos de buena calidad con un brix de al menos 8,0 o 9,0 o preferentemente de al menos 10,0, 11,0 o superior. Este QTL que confiere resistencia al CVYV se denomina en el presente documento *cyv_3.1*.

Las plantas cultivadas de sandía que comprenden el *cyv_3.1* en una, dos, tres o cuatro copias incluyen plantas diploides o plantas doble-haploides, plantas tetraploides y plantas triploides (por ejemplo, plantas híbridas triploides que producen frutos sin semillas), así como semillas a partir de las cuales pueden cultivarse estas plantas, y cualquier

parte de las plantas que comprenden el *cyv_3.1* (frutos, partes de frutos, portainjertos, púas, células, polen, anteras, óvulos, tallos, hojas, cotiledones, hipocotilos, flores, cultivos celulares o de tejidos *in vitro*, propagaciones *in vitro*, etc.).

También es objeto de la invención proporcionar marcadores moleculares estrechamente ligados al QTL *cyv_3.1* que confiere resistencia al CVYV y el uso de uno o más de dichos marcadores moleculares en a) la obtención de plantas cultivadas de sandía que comprenden *cyv_3.1* en una (por ejemplo, heterocigoto en un diploide), dos (por ejemplo, homocigóticos en plantas diploides y doble-haploides), tres (en un triploide) o cuatro copias (en un tetraploide), cuyo uso se describe en el presente documento pero que no es conforme a la invención, y/o b) el cribado de plantas, partes de plantas, células o ADN genómico para detectar la presencia de uno o más de estos marcadores moleculares y, por tanto, la presencia de *cyv_3.1*, tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas. Tales procedimientos de cría se describen en el presente documento, pero no están de acuerdo con la invención y tales procedimientos de cribado están comprendidos en el presente documento, como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

DEFINICIONES GENERALES

El verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para indicar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. Además, la referencia a un elemento por medio del 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. Por lo tanto, el artículo indefinido "un" o "una" normalmente significa "al menos uno", por ejemplo "una planta" se refiere también a varias células vegetales, etc. De manera similar, "un fruto" o "una planta" también se refiere a una pluralidad de frutos y plantas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "planta" incluye la planta entera o cualquier parte o derivado de la misma, preferentemente que tenga la misma composición genética que la planta de la que se obtiene, tales como órganos de la planta (por ejemplo, frutos, hojas, flores, anteras, etc., cosechados o no cosechados), células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejidos de células vegetales a partir de los cuales se pueden regenerar plantas enteras, callos vegetales, grupos de células vegetales, trasplantes de plantas, plántulas, células vegetales que están intactas en plantas, clones de plantas o micropropagaciones, o partes de plantas, como esquejes de plantas, embriones, polen, anteras, óvulos, frutos (por ejemplo, tejidos u órganos cosechados), flores, hojas, semillas, plantas propagadas clonalmente, raíces, tallos, puntas de raíces, injertos (injertos y/o portainjertos) y similares. También se incluye cualquier etapa de desarrollo, tales como plántulas, esquejes antes o después del enraizamiento, etc. Cuando se hace referencia a "semillas de una planta", éstas se refieren a semillas a partir de las cuales se puede cultivar la planta o a semillas producidas en la planta. después de la autofecundación o la fertilización cruzada.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "variedad" o "cultivar" designa una agrupación de plantas dentro de un único taxón botánico del rango más bajo conocido, que puede definirse por la expresión de las características resultantes de un genotipo o una combinación de genotipos determinados.

El término "alelo(s)" significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen en un locus particular, todos los cuales alelos se relacionan con un rasgo o característica en un locus específico. En una célula diploide de un organismo, los alelos de un 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. Puede tratarse de alelos idénticos del gen (homocigóticos) o de dos alelos diferentes (heterocigóticos).

"F1, F2, F3, etc." se refiere a las generaciones emparentadas consecutivas que siguen a un cruce entre dos plantas o líneas parentales. Las plantas cultivadas a partir de las semillas producidas por el cruce de dos plantas o líneas se denominan generación F1. La autofecundación de las plantas F1 da lugar a la generación F2, etc. La planta "híbrida F1" (o semilla híbrida F1) es la generación obtenida del cruce de dos líneas progenitoras endogámicas. Así pues, las semillas híbridas F1 son semillas a partir de las cuales crecen plantas híbridas F1. Los híbridos F1 son más vigorosos y de mayor rendimiento, debido a la heterosis. Las líneas endogámicas son esencialmente homocigóticas en la mayoría de los loci del genoma.

Una "línea vegetal" o "línea de cría" se refiere a una planta y su progenie. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "línea endogámica" se refiere a una línea de plantas que se ha autofecundado repetidamente y es casi homocigótica. Así, una "línea endogámica" o "línea parental" se refiere a una planta que ha sido sometida a varias generaciones (por ejemplo, al menos 5, 6, 7 o más) de endogamia, dando lugar a una línea de plantas con una gran uniformidad.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ADN (genómico) que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN mensajero (ARNm) en una célula, y una región reguladora vinculada operativamente (por ejemplo, un promotor). Los diferentes alelos de un gen son, por lo tanto, diferentes alternativas de forma del gen, que pueden ser en forma de, por ejemplo, diferencias en uno o más nucleótidos de la secuencia de ADN genómico (por ejemplo, en la secuencia del promotor, las secuencias de los exones, las secuencias de los intrones, etc.), el ARNm y/o la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

El término "locus" (loci plural) significa un lugar o lugares específicos o un sitio en un cromosoma donde, por ejemplo, se encuentra un gen o un marcador genético. El locus CVYV (o locus que confiere resistencia a CVYV) es, por tanto, la ubicación en el genoma de la sandía donde se encuentra el QTL denominado *cyv_3.1*. El locus *cyv_3.1* se introduce en el cromosoma 3 de la sandía cultivada (utilizando la asignación cromosómica del genoma publicado de la sandía que se encuentra en <http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi> en "Watermelon: Genome", "Watermelon genome (97103) - version 1" y como se describe en Guo S, Zhang J, Sun H, Salse J, Lucas W, Zhang H, Zheng Y, Mao L, Ren Y, Wang Z (2013) "The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions" (Nature Genetics 45:51-58), es decir, el *cyv_3.1*, se introduce en el genoma de la sandía cultivada (es decir, en el cromosoma 3) a partir de una sandía silvestre.

Un "locus de rasgo cuantitativo", o "QTL" es un locus cromosómico que codifica para uno o más alelos que afectan a la expresividad de un fenotipo de distribución continua (cuantitativa). El locus de rasgo cuantitativo que confiere resistencia al CVYV (o "QTL CVYV") se denomina *cyv_3.1* en el presente documento.

"Planta diploide" se refiere a una planta, partes vegetativas de la planta o semilla a partir de la cual se puede cultivar una planta diploide, que tiene dos conjuntos de cromosomas (homólogos), designados aquí como 2n.

Una "planta DH" o "planta doble haploide" es una planta diploide producida duplicando el genoma haploide de la planta diploide utilizando, por ejemplo, técnicas *in vitro*. Una planta DH es, por tanto, homocigótica en todos los loci.

"Planta triploide" se refiere a una planta, parte(s) de planta vegetativa o semilla a partir de la cual se puede cultivar una planta triploide, que tiene tres conjuntos de cromosomas, designados en el presente documento como 3n.

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

Por "planta polinizadora" o "polinizador" se entiende la planta diploide (endogámica o híbrida), o partes de la misma (por ejemplo, su polen o púa), adecuada como polinizador para inducir la fructificación en plantas triploides. Una planta polinizadora es, por tanto, capaz de provocar un buen cuajado (y un buen rendimiento de frutos triploides) de las plantas triploides, al producir una cantidad adecuada de polen en el momento del día y durante el periodo de tiempo adecuados.

"Planta triploide híbrida" o "triploide F1" o "híbrido triploide" es una planta triploide cultivada a partir de semillas híbridas, triploides obtenidas de la fecundación cruzada de un progenitor diploide macho con un progenitor tetraploide hembra. El parental masculino (la planta polinizadora) se utiliza para inducir la fructificación y la producción de semillas en un parental femenino tetraploide, lo que da como resultado frutos que contienen semillas triploides híbridas F1. Tanto el parental masculino como el parental femenino utilizados para producir semillas triploides F1 son consanguíneos, de modo que cada línea parental es casi homocigótica y estable.

Los "frutos sin semillas" son frutos triploides, producidos en una planta triploide después de que una planta polinizadora induzca la fructificación, cuyos frutos no contienen semillas maduras. El fruto puede contener uno o varios óvulos blancos, pequeños y comestibles.

"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 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 interplantarse con las plantas triploides en la misma hilera (por ejemplo, en colinas dentro de cada hilera). Los polinizadores también pueden plantarse entre hileras 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 patrón de una planta diferente. Los portainjertos adecuados son conocidos en la técnica. Las plantas de sandía con un patrón diferente se denominan "injertadas".

"Plantar" o "plantado" se refiere a sembrar (siembra directa) o trasplantar plántulas (plántulas) a un campo a máquina o a mano.

La "propagación vegetativa" o "propagación clonal" se refiere a la propagación de plantas a partir de tejido vegetativo, por ejemplo, mediante propagación *in vitro* o procedimientos de injerto (utilizando púas). La propagación *in vitro* implica el cultivo *in vitro* de células o tejidos y la regeneración de una planta entera a partir del cultivo *in vitro*. El injerto consiste en la propagación de una planta original mediante el injerto en un rizoma. De este modo, se pueden generar clones (es decir, reproducciones vegetativas genéticamente idénticas) de la planta original mediante cultivo *in vitro* o injerto. El "cultivo celular" o "cultivo de tejidos" se refiere al cultivo *in vitro* de células o tejidos de una planta. "Regeneración" se refiere al desarrollo de una planta a partir de un cultivo celular o de tejidos o de la propagación vegetativa. Por "célula no propagadora" se entiende una célula que no puede regenerarse en una planta completa.

"Recesivo" se refiere a un alelo que expresa su fenotipo (por ejemplo, resistencia al CVYV) cuando no hay ningún

alelo dominante presente en el genoma. El *cyv_3.1* de acuerdo con la invención da lugar a una planta resistente al CVYV cuando está presente en dos copias en una planta diploide, en cuatro copias en una planta tetraploide o en tres copias en una planta triploide, por lo que un alelo dominante está ausente en estas plantas. El alelo dominante se denomina en el presente documento alelo de tipo silvestre (*WT*), que se encuentra en las plantas que carecen de la introgresión *cyv_3.1*.

"Sandía cultivada" se refiere en el presente documento a *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris* y que posee buenas características agronómicas, especialmente la producción de frutos comercializables de buena calidad y uniformidad.

"Sandía silvestre" se refiere en el presente documento a *Citrullus lanatus* ssp. *lanatus* y *Citrullus lanatus* ssp. *mucosospermus*, que producen frutos de baja calidad y escasa uniformidad.

["Marcador SNP" se refiere a un Polimorfismo de Nucleótido Único entre sandía cultivada y silvestre y los marcadores SNP proporcionados en el presente documento están estrechamente ligados al *cyv_3.1* encontrado en las accesiones de sandía silvestre resistentes al CVYV. El SNP_02 comprende una "G" (Guanina) en el nucleótido 7.664.093 del cromosoma 3 en lugar de una "A" (Adenina) y el SNP_03 comprende una "C" (Citosina) en el nucleótido 7.693.225 del cromosoma 3, en lugar de una "T" (Timina). El término "genotipo SNP" se refiere al nucleótido presente en el SNP concreto. Cuando se hace referencia al "genotipo de resistencia" o al "genotipo CVYV" o al "genotipo *cyv_3.1*", se hace referencia al nucleótido de la accesión silvestre resistente al CVYV. Así, el "genotipo de resistencia" para el SNP_02 es 'G' (Guanina) en el nucleótido 7.664.093 del cromosoma 3 y el del SNP_03 es 'C' (Citosina) en el nucleótido 7.693.225 del cromosoma 3. El otro nucleótido (alternativo) se refiere al nucleótido encontrado en la sandía cultivada que carece de la introgresión y puede denominarse genotipo *WT* o genotipo susceptible.

El término "haplotipo SNP" se refiere al nucleótido presente en varias localizaciones SNP. Cuando se habla de "haplotipo CVYV", "haplotipo de resistencia" o "haplotipo *cyv_3.1*", se hace referencia al genotipo SNP de varios de los marcadores SNP vinculados a *cyv_3.1*. Por ejemplo, el haplotipo-A comprende nucleótidos G-G-C para SNP_01, SNP_02 y SNP_03, respectivamente. El haplotipo B comprende los nucleótidos A-G-C de SNP_01, SNP_02 y SNP_03, respectivamente.

"Genoma de la sandía cultivada" y "posición física en el genoma de la sandía cultivada" y "cromosoma 3" se refiere al genoma físico de la sandía cultivada, world wide web en <http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi> bajo "Watermelon: Genome", "Watermelon genome (97103) - version 1" y los cromosomas y la posición físicos en los cromosomas. Así, por ejemplo, el SNP_01 está localizado en el nucleótido (o "base") situado físicamente en el nucleótido 7.586.752 del cromosoma 3, el SNP_02 está localizado en el nucleótido (o "base") situado físicamente en el nucleótido 7.664.093 del cromosoma 3, y el SNP_03 está localizado en el nucleótido (o "base") situado físicamente en el nucleótido 7.693.225 del cromosoma 3. El cromosoma 3 tiene un tamaño físico de 0 a 28,9 Mb.

Un "fragmento de introgresión" o "segmento de introgresión" o "región de introgresión" se refiere a un fragmento cromosómico (o parte o región cromosómica) que se ha introducido en otra planta de la misma especie o de una especie afín mediante cruzamiento o técnicas tradicionales de fitomejoramiento, tales como el retrocruzamiento, es decir, el fragmento introgresado es el resultado de los procedimientos de fitomejoramiento a los que se refiere el verbo "introgresar" (tales como el retrocruzamiento). En la sandía, las muestras de sandía silvestre se pueden utilizar para introducir fragmentos del genoma silvestre en el genoma de la sandía cultivada. Así pues, dicha planta de sandía cultivada tiene un "genoma de *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris* cultivado", pero comprende en el genoma un fragmento de una sandía silvestre, por ejemplo, un fragmento de introgresión de *Citrullus lanatus* ssp. *lanatus* o *Citrullus lanatus* ssp. *mucosospermus*. Así, por ejemplo, se proporciona en el presente documento una sandía cultivada que comprende un genoma de sandía cultivada, y en ese genoma un fragmento de introgresión de sandía silvestre en el cromosoma 3 que comprende el QTL que confiere resistencia al CVYV denominado en el presente documento *cyv_3.1*. Se entiende que el término "fragmento de introgresión" nunca incluye un cromosoma entero, sino sólo una parte de un cromosoma. El fragmento de introgresión puede ser grande, por ejemplo incluso tres cuartos o la mitad de un cromosoma, pero preferentemente es más pequeño, tal como aproximadamente 15 Mb o menos, tal como aproximadamente 10 Mb o menos, aproximadamente 9 Mb o menos, aproximadamente 8 Mb o menos, aproximadamente 7 Mb o menos, aproximadamente 6 Mb o menos, aproximadamente 5 Mb o menos, aproximadamente 4 Mb o menos, aproximadamente 3 Mb o menos, aproximadamente 2,5 Mb o 2 Mb o menos, aproximadamente 1 Mb (equivale a 1.000.000 pares de bases) o menos, o aproximadamente 0,5 Mb (equivale a 500.000 pares de bases) o menos, tal como aproximadamente 200.000 pb (equivale a 200 kilopares de bases) o menos, aproximadamente 100.000 pb (100 kb) o menos, aproximadamente 50.000 pb (50 kb) o menos, aproximadamente 30.000 pb (30 kb) o menos.

Un cromosoma 3 de sandía cultivada que comprende un fragmento de introgresión que comprende el QTL *cyv_3.1* que confiere resistencia al CVYV también se denomina en el presente documento "cromosoma recombinante 3".

La "resistencia al CVYV" se refiere a la ausencia de síntomas del CVYV en las hojas adultas (y preferentemente también en los frutos) o a un número de síntomas estadísticamente significativo inferior al de las plantas de control susceptibles, tal como la variedad susceptible Sugar Baby. La resistencia al CVYV puede, por ejemplo, evaluarse utilizando un ensayo de resistencia al CVYV o, alternativamente, en el campo o en túnel en zonas de cultivo donde se

produce la infección natural por el CVYV. Son posibles diversos ensayos de resistencia al CVYV, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos, pero en general un ensayo de resistencia al CVYV puede, por ejemplo, implicar la inoculación artificial de la primera hoja verdadera expandida de una pluralidad de plántulas, seguida opcionalmente de una segunda inoculación de la hoja, por ejemplo, cuatro o cinco días después, incubar las plántulas y las plantas testigo durante un período de tiempo adecuado y en condiciones adecuadas y evaluar los síntomas del virus una o más veces después de la inoculación (por ejemplo, 20 días, 30 días, 40 días, 50 días, 60 días después de la inoculación). El control susceptible debe presentar síntomas graves para que la prueba tenga éxito. Preferentemente se incluyen al menos 10, 11, 12, 13, 14 o más plantas por genotipo en cada repetición y preferentemente se realizan varias repeticiones. En un aspecto, cuando se examina la resistencia, una línea o variedad se considera resistente si al menos el 70%, 80%, 90% o 100% de las plantas de la línea o variedad no muestra síntomas, mientras que al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de las plantas de la línea o variedad de control susceptible muestra síntomas.

"Brix" o "grado Brix" o "° brix" se refiere al contenido medio de sólidos solubles totales medido en varias frutas maduras utilizando un refractómetro. Preferentemente, se calcula la media de al menos tres frutos, cada uno de ellos medido entre el centro y la corteza del fruto cortado y abierto.

Por "comercializable" en relación con la calidad de la fruta se entiende que las sandías son aptas para la venta para consumo en fresco, tienen buen sabor (sin sabores extraños), un grado brix de al menos 9,0, preferentemente de al menos 10,0 o al menos 11,0 y preferentemente también un color uniforme de la pulpa de la fruta, siendo por ejemplo, blanco (por ejemplo, la variedad Cream of Saskatchewan), amarillo (por ejemplo, la variedad Yamato Cream 1), naranja (por ejemplo, la variedad Tendersweet), rosa (por ejemplo, la variedad Sadul), rojo rosado (por ejemplo, la variedad Crimson Sweet), rojo (por ejemplo, la variedad Sugar Baby) o rojo oscuro (por ejemplo, la variedad Dixie Lee).

"Color uniforme de la pulpa de la fruta" significa que el color en toda la fruta madura, cuando se corta abierta por el medio (sección media), se distribuye uniformemente por toda la pulpa de la fruta, es decir, no es irregular. Así, un fruto rojo es rojo en toda la pulpa y no contiene manchas blancas. Un ejemplo de fruto de color rojo uniforme es la variedad diploide Premium F1 (Nunhems).

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

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

La "homogeneidad" o "uniforme" se refiere a las características genéticas y fenotípicas de una línea o variedad vegetal. Las líneas endogámicas son genéticamente muy uniformes ya que son producidas por varias generaciones de endogamia. Asimismo, los híbridos F1 y los híbridos triploides que se producen a partir de dichas líneas endogámicas son muy uniformes en sus características y rendimiento genotípicos y fenotípicos.

El término "alelo CVYV" o "alelo de resistencia CVYV" se refiere a un alelo que se encuentra en el locus *cyv* 3.1 introgresado en la sandía cultivada (en el cromosoma 3 de *C. lanatus* ssp. *vulgaris* cultivada) a partir de una sandía silvestre. Por lo tanto, el término "alelo CVYV" también engloba los alelos CVYV obtenidos de diferentes sandías silvestres. Cuando no hay ningún alelo susceptible dominante (tipo silvestre, *WT*) en el locus del genoma (es decir, en la sandía diploide hay dos copias del alelo CVYV, en la sandía triploide 3 copias y en la sandía tetraploide 4 copias), la línea o variedad de la planta será resistente al CVYV. En las plantas de sandía cultivadas que carecen del fragmento de introgresión, el alelo que se encuentra en el mismo locus del cromosoma 3 se denomina alelo "tipo silvestre" (*WT*). Como el *cyv*_3.1 es recesivo, no debe estar presente ningún alelo de tipo silvestre para expresar el fenotipo de resistencia al CVYV. Así, dos cromosomas recombinantes 3 (en líneas o variedades diploides de sandía), tres cromosomas recombinantes 3 (en líneas o variedades triploides de sandía) o cuatro cromosomas recombinantes 3 (en líneas o variedades tetraploides de sandía) necesitan estar presentes para expresar el fenotipo de resistencia al CVYV. Los genotipos SNP y los haplotipos SNP proporcionados en el presente documento son indicativos de la presencia del fragmento de introgresión que comprende *cyv*_3.1.

Se dice que un elemento genético, un fragmento de introgresión o un gen o alelo que confiere un rasgo (como la resistencia al CVYV) es "obtenible de" o puede "obtenerse de" o "derivarse de" o puede "derivarse de" o "como está presente en" o "como se encuentra en" una planta o semilla o tejido o célula si puede transferirse de la planta o semilla en donde está presente a otra planta o semilla en donde no está presente (tal como en una línea o variedad susceptible al CVYV) utilizando técnicas de mejoramiento tradicionales sin dar lugar a un cambio fenotípico de la planta receptora, aparte de la adición del rasgo conferido por el elemento genético, locus, fragmento de introgresión, gen o alelo. Los términos se utilizan indistintamente y el elemento genético, el locus, el fragmento de introgresión, el gen o el alelo pueden transferirse a cualquier otro fondo genético que carezca del rasgo. No sólo se pueden utilizar las semillas depositadas que comprenden el elemento genético, el locus, el fragmento de introgresión, el gen o el alelo, sino

también la progenie/descendencia de dichas semillas que se han seleccionado para retener el elemento genético, el locus, el fragmento de introgresión, el gen o el alelo, y que se incluyen en el presente documento, como las variedades comerciales desarrolladas a partir de las semillas depositadas o de sus descendientes. Asimismo, pueden identificarse otras fuentes silvestres que contengan el elemento genético, locus, fragmento de introgresión, gen o alelo (por ejemplo, el *cyv_3.1* o una variante del mismo) y utilizarse para transferirlo a la sandía cultivada. El experto puede determinar si una planta (o ADN genómico, célula o tejido de una planta) comprende el mismo elemento genético (o variante del mismo), locus, fragmento de introgresión, gen o alelo que se puede obtener a partir de las semillas depositadas utilizando una o más técnicas conocidas en la técnica, tales como ensayos fenotípicos, secuenciación del genoma completo, análisis de marcadores moleculares, mapeo de rasgos, pintura cromosómica, pruebas de alelismo y similares, o combinaciones de técnicas.

Una secuencia "variante" u "ortóloga" o una "variante *cyv_3.1*" se refiere a un QTL que confiere resistencia al CVYV (*cyv_3.1*), o a un fragmento de introgresión que comprende el QTL, que se deriva de una planta silvestre de sandía diferente de la *cyv_3.1* presente en NCIMB42449 o en NCIMB42450, o en NCIMB42666, pero cuya variante comprende uno o más de los genotipos de resistencia del marcador o marcadores SNP, o de los haplotipos SNP, ligados a *cyv_3.1* y en donde la secuencia genómica variante comprende una identidad de secuencia sustancial con la SEQ ID NO que comprende el SNP (una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3), es decir, al menos 85%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% de identidad de secuencia o más. El SNP en dicha secuencia variante se denomina entonces "en un nucleótido correspondiente a" o "en una posición de nucleótido correspondiente a" la posición del SNP en la SEQ ID NO original. Así, cuando la secuencia original y la secuencia variante se alinean por pares en toda su longitud, un SNP en, por ejemplo, la posición 76 de la secuencia original estará presente en la variante en el nucleótido correspondiente al nucleótido 76 de la secuencia original. Por tanto, cuando en el presente documento se hace referencia a un determinado genotipo de resistencia a SNP en una secuencia genómica específica (seleccionada de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3), esto abarca también el genotipo de resistencia SNP en variantes de la secuencia genómica, es decir, el genotipo de resistencia SNP en una secuencia genómica que comprenda al menos 85%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99% de identidad de secuencia con la secuencia referida (seleccionada de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3). Por lo tanto, cualquier referencia en el presente documento a cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 3 en un aspecto también abarca una variante de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3, comprendiendo dicha variante al menos 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con dicha secuencia.

El término "ensayo de marcadores" se refiere a un ensayo de marcadores moleculares que puede utilizarse para comprobar si en el cromosoma 3 de la sandía cultivada está presente una introgresión de una sandía silvestre cuyo fragmento de introgresión comprende el QTL de resistencia al CVYV (*cyv_3.1* o variante) (o si una accesión de sandía silvestre comprende el *cyv_3.1* o una variante del mismo en su genoma), determinando el genotipo de uno o más marcadores vinculados al *cyv_3.1*, por ejemplo el genotipo de uno o más marcadores SNP seleccionados de SNP_02 y SNP_03 y (opcionalmente) cualquier marcador específico del genoma de la sandía silvestre dentro de una distancia de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0,5 Mb, 0,1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb o menos de SNP_02 o SNP_03. El paso de "determinación del genotipo" también puede denominarse "genotipado". Opcionalmente, el ensayo de marcadores también puede incluir el genotipado de SNP_01 y/o SNP_04 y/o cualquier marcador específico del genoma de sandía silvestre dentro de una distancia de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0,5 Mb, 0,1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb o menos de SNP_01 y/o SNP_04.

"Media" o "promedio" se refiere en el presente documento a la media aritmética y ambos términos se utilizan indistintamente. El término "media" o "promedio" se refiere, pues, a la media aritmética de varias mediciones. El experto entiende que el fenotipo de una línea o variedad de planta depende en cierta medida de las condiciones de crecimiento y que, por lo tanto, medias aritméticas de al menos 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más plantas (o partes de plantas) son medido, preferentemente en diseños experimentales aleatorios con varias repeticiones y plantas de control adecuadas (por ejemplo, plantas de la variedad Sugar Baby o cualquier otra variedad o línea susceptible al CVYV) cultivadas en las mismas condiciones en el mismo experimento. "Estadísticamente significativo" o "estadísticamente significativo" diferente o "significativamente" diferente se refiere a una característica de una línea o variedad de planta que, cuando se compara con un control adecuado, muestra una diferencia estadísticamente significativa en esa característica (por ejemplo, el valor p es menor que 0,05, $p < 0,05$, utilizando ANOVA) del (media del) control.

El término "técnicas de reproducción tradicionales" abarca en el presente documento cruce, retrocruzamiento, autofecundación, selección, producción de doble haploide, duplicación de cromosomas, rescate de embriones, fusión de protoplastos, selección asistida por marcadores, reproducción por mutación, etc., todo ello como lo conoce el obtensor (es decir, procedimientos distintos de la modificación/transformación/procedimientos transgénicos), mediante los cuales, por ejemplo, se puede obtener, identificar y/o transferir un cromosoma 3 recombinante.

"Retrocruzamiento" se refiere a un procedimiento de mejora mediante el cual un rasgo (único), tal como QTL de resistencia al CVYV, puede transferirse de un fondo genético (a menudo inferior) (por ejemplo, una sandía silvestre; también denominada "donante") a otro fondo genético (a menudo superior) (también denominado "progenitor recurrente"), por ejemplo, una sandía cultivada. Una descendencia de un cruce (por ejemplo, una planta F1 obtenida cruzando, por ejemplo, una sandía silvestre con una sandía cultivada, o una planta F2 o una planta F3, etc., obtenida de la autofecundación de la F1), se "retrocruza" con el padre, por ejemplo, el fondo genético superior, por ejemplo, al

padre cultivado. Después de repetidos retrocruzamientos, el rasgo de un trasfondo genético (a menudo inferior) se habrá incorporado al otro trasfondo genético (a menudo superior).

La "selección asistida por marcadores" o "MAS" es un procedimiento que utiliza la presencia de marcadores moleculares (tales como marcadores SNP), que están genéticamente vinculados a un locus particular o a una región cromosómica particular (por ejemplo, fragmento de introgresión), para seleccionar plantas por la presencia del locus o región específica (por ejemplo, el fragmento de introgresión). Por ejemplo, se puede usar un marcador molecular genéticamente ligado a QTL de resistencia al CVYV para detectar y/o seleccionar plantas de sandía, o partes de plantas, que comprenden el QTL en el cromosoma 3. Cuanto más estrecho sea el vínculo genético del marcador molecular con el locus, menor será la probabilidad de que el marcador se disocie del locus mediante recombinación meiótica. Por ejemplo, se puede usar un marcador molecular genéticamente ligado al QTL de resistencia al CVYV para detectar y/o seleccionar plantas de arena, o partes de plantas, que comprenden el QTL en el cromosoma 3.

Un marcador molecular dentro de 5 Mb, 3 Mb, 2,5 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0,5 Mb, 0,4Mb, 0,3Mb, 0,2Mb, 0,1 Mb, 74kb, 50kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb o menos de otro marcador, o de un locus, se refiere a un marcador que está físicamente situado dentro de los 5 Mb, 3 Mb, 2,5 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0,5 Mb, 0,4Mb, 0,3Mb, 0,2Mb, 0,1 Mb, 74kb, 50kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb o menos, de la región de ADN genómico que flanquea al marcador (es decir, cualquiera de los lados del marcador). Véase, por ejemplo, el diagrama de la Figura 1, que muestra una región introgresada de sandía silvestre que comprende *cyv_3.1*, donde se muestran marcadores dentro de 5Mb de la región ampliada en el diagrama.

"puntuación LOD" (logaritmo (base 10) de probabilidades) se refiere a una prueba estadística utilizada a menudo para el análisis de ligamiento en poblaciones animales y vegetales. La puntuación LOD compara la probabilidad de obtener los datos de la prueba si los dos loci (loci de marcadores moleculares y/o un locus de rasgo fenotípico) están realmente vinculados, con la probabilidad de observar los mismos datos por puro azar. Las puntuaciones LOD positivas favorecen la presencia de enlace y una puntuación LOD superior a 3,0 se considera una prueba de enlace. Una puntuación LOD de +3 indica una probabilidad de 1000 a 1 de que el enlace observado no se haya producido por casualidad.

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

Una "secuencia de ácido nucleico aislada" o "ADN aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ya no se encuentra en el entorno natural del que se aisló, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped bacteriana o en el genoma nuclear o plastidial de una planta. Cuando en el presente documento se hace referencia a una "secuencia", se entiende que se hace referencia a la molécula que tiene dicha secuencia, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico.

Una "célula huésped" o una "célula huésped recombinante" o "célula transformada" son términos que se refieren a una nueva célula individual (u organismo) que surge como resultado de la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico en dicha célula. La célula huésped es preferentemente una célula vegetal o una célula bacteriana. La célula huésped puede contener el ácido nucleico como una molécula de replicación extracromosómica (episomal), o comprende el ácido nucleico integrado en el genoma nuclear o plastidial de la célula huésped, o como cromosoma introducido, por ejemplo, minicromosoma.

La "identidad de secuencia" y la "similitud de secuencia" pueden determinarse mediante la alineación de dos secuencias peptídicas o de dos nucleótidos utilizando algoritmos de alineación global o local. Las secuencias pueden considerarse "sustancialmente idénticas" o "esencialmente similares" cuando se alinean de forma óptima, por ejemplo, con los programas GAP o BESTFIT o con el programa "Needle" de Emboss (utilizando los parámetros por defecto, véase más adelante) y comparten al menos un determinado porcentaje mínimo de identidad de secuencia (como se define más adelante). Estos programas utilizan el algoritmo de alineación global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias en toda su longitud, maximizando el número de coincidencias y minimizando el número de huecos. En general, se utilizan los parámetros por defecto, con una penalización de creación de hueco = 10 y una penalización de extensión de hueco = 0,5 (tanto para alineaciones de nucleótidos como de proteínas). Para los nucleótidos la matriz de puntuación por defecto utilizada es DNAFULL y para las proteínas la matriz de puntuación por defecto es Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 10915-10919). Los alineamientos de secuencias y las puntuaciones de los porcentajes de identidad de secuencias pueden determinarse, por ejemplo, mediante programas informáticos, como EMBOSS, disponible en la red mundial en ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Alternativamente, la similitud o identidad de la secuencia puede determinarse mediante la búsqueda en bases de datos como FASTA, BLAST, etc., pero los resultados deben recuperarse y alinearse por pares para comparar la identidad de la secuencia. Dos proteínas o dos dominios proteicos, o dos secuencias de ácidos nucleicos tienen "identidad de secuencia sustancial" si el porcentaje de identidad de secuencia es al menos 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 98 %, 99 % o más (por ejemplo, al menos 99,1, 99,2 99,3 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 o más (según lo determinado por la "aguja" de Emboss utilizando parámetros predeterminados, es decir, penalización por creación de espacios = 10, penalización por extensión de espacios = 0,5, utilizando la matriz de puntuación DNAFULL para ácidos nucleicos y Blosum62 para proteínas).

Cuando se hace referencia a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ADN genómico) que tiene una "identidad de secuencia sustancial con" una secuencia de referencia o que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 %, por ejemplo, al menos un 85 %, un 90 %, un 92 %, un 95 %, un 98 %, un 99 %, un 99,2 %, un 99,5 %, un 99,9 % o un 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de referencia, en una realización, dicha secuencia de nucleótidos se considera sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos dada y puede identificarse utilizando condiciones de hibridación rigurosas. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico comprende una o más mutaciones en comparación con la secuencia de nucleótidos dada, pero aun así puede identificarse utilizando condiciones de hibridación estrictas.

Las "condiciones estrictas de hibridación" pueden utilizarse para identificar secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas a una secuencia de nucleótidos determinada. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán diferentes en distintas circunstancias. Por lo general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C inferiores al punto de fusión térmica (T_f) para las secuencias específicas a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_f es la temperatura (con una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente adaptada. Generalmente, se elegirán condiciones rigurosas en las que la concentración de sal sea de aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y la temperatura sea de al menos 60 °C. La reducción de la concentración de sal y/o el aumento de la temperatura aumentan la rigurosidad. Las condiciones rigurosas para las hibridaciones de ARN-ADN (transferencias Northern utilizando una sonda, por ejemplo, de 100 nt) son, por ejemplo, las que incluyen al menos un lavado en 0,2X SSC a 63 °C durante 20 minutos o condiciones equivalentes. Las condiciones rigurosas para la hibridación de ADN-ADN (transferencias Southern utilizando una sonda, por ejemplo, de 100 nt) son, por ejemplo, las que incluyen al menos un lavado (normalmente 2) en 0,2X SSC a una temperatura de al menos 50 °C, de modo habitual aproximadamente 55 °C, durante 20 min o condiciones equivalentes. Véase también Sambrook *et al.* (1989) y Sambrook y Russell (2001).

"Prueba de alélismo" se refiere a una prueba genética mediante la cual se puede probar si un fenotipo, por ejemplo, la resistencia al CVYV, observada en dos líneas o variedades de plantas, está determinada por el mismo gen o locus o por genes o loci diferentes. Por ejemplo, las plantas que se van a ensayar se cruzan entre sí (preferentemente después de la autofecundación para garantizar que sean homocigotas), se determina la segregación de los fenotipos entre la F1 o la progenie autofecundada o retrocruzada adicional. La proporción de segregación indica si los genes o loci son alélicos o si son diferentes. Así, por ejemplo, si los alelos son del mismo gen, las plantas F1 (producidas por el cruce de dos plantas homocigóticas) tendrán todas (100%) el mismo fenotipo, mientras que puede no ser así si los alelos son de genes diferentes. Del mismo modo, en las plantas F2, la segregación fenotípica indicará si están implicados los mismos genes o genes diferentes.

El "mapeo fino" se refiere a procedimientos mediante los cuales la posición de un QTL puede determinarse con mayor precisión (reducirse). Por ejemplo, puede analizarse la segregación del rasgo (por ejemplo, la resistencia al CVYV) en una gran población y pueden seleccionarse los marcadores de ADN del cromosoma 3 y las plantas que comprenden eventos de recombinación en la región del cromosoma 3 que comprende el locus de resistencia al CVYV (véase, por ejemplo, la zona rayada de la Figura 1), a fin de determinar entre qué par de marcadores SNP se encuentra el QTL. También se pueden buscar marcadores adicionales entre el par de marcadores más vinculados para marcar el intervalo en donde se encuentra el QTL.

Figura 1:

La Figura 1 muestra en el diagrama de la izquierda un cromosoma 3 recombinante que comprende un fragmento de introgresión de sandía silvestre (región rayada) que abarca una región de 5 Mb a cada lado de los marcadores SNP. Las regiones cultivadas de sandía no son rayadas (blancas). En las dos ampliaciones (diagrama central y diagrama de la derecha) se muestran los marcadores SNP SNP_01 a SNP_04 para una planta resistente a CYCV y susceptible a ZYMV (diagrama central) y para una planta resistente a CVYV y resistente a ZYMV (diagrama de la derecha), incluyendo los genotipos SNP y las localizaciones (la localización cromosómica se indica en Mb, por ejemplo 7,5 Mb para SNP_01 y 7,7Mb para SNP_04): El SNP_01 puede ser AA o GG en función del haplotipo; el SNP_02 tiene el genotipo de resistencia GG; el SNP_03 tiene el genotipo de resistencia CC; y el SNP_04 tiene el genotipo TT (que indica susceptibilidad al ZYMV) o el genotipo GG (que indica resistencia al ZYMV, es decir, presencia de una región (región sombreada) que comprende el locus *zym* en forma homocigótica).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los inventores encontraron un QTL recesivo en el cromosoma 3 de accesiones silvestres de sandía, que comprende un locus que confiere resistencia al CVYV. Encontraron dos haplotipos diferentes vinculados al QTL que confiere resistencia, el haplotipo A comprendía los nucleótidos G-G-C en SNP_01, SNP_02 y SNP_03, respectivamente, y el haplotipo B comprendía los nucleótidos A-G-C en SNP_01, SNP_02 y SNP_03, respectivamente.

Además, SNP_02 y SNP_03 (los dos SNPs comunes de ambos haplotipos de resistencia) estaban estrechamente ligados al locus *cyv_3.1* y se utilizaron para retrocruzar el QTL *cyv_3.1* en sandía cultivada susceptible al CVYV a partir de dos accesiones de sandía silvestre diferentes, introduciendo así la resistencia al CVYV en sandía cultivada que produce frutos comercializables.

Las semillas de dos líneas endógamas diploides que comprenden *cyv_3.1* en forma homocigótica han sido

- depositadas por Nunhems B.V. en el NCIMB con los números de acceso NCIMB 42449 y NCIMB42450. Estas dos líneas comprenden SNP_02 y SNP_03 en forma homocigota y tienen el haplotipo B del SNP. Los frutos tienen semillas, son frutos de pulpa roja con un brix de 11,0 y son frutos comercializables. Las plantas son resistentes al CVYV y susceptibles al ZYMV (y también carecen del marcador *eIF4E* de Ling *et al.*, 2008 *supra*). Una de las líneas tiene frutos con corteza de tipo Crimson Sweet (NCIMB 42449), la otra (NCIMB42450) tiene frutos con corteza Jubilee (como en Premium F1). El peso promedio de los frutos es de 7 kg y 8 kg respectivamente. Además, se han generado varias líneas endocriadas cultivadas que comprenden el locus *cyv_3.1*, que tienen pesos promedio de fruto que oscilan de aproximadamente 2 kg a aproximadamente 12 kg.
- 10 Las semillas de otra línea endocriada diploide de élite que comprende *cyv_3.1* en forma homocigota han sido depositadas por Nunhems B.V. en el NCIMB con el número de acceso NCIMB 42666. Esta línea comprende SNP_02 y SNP_03 en forma homocigota y tiene el haplotipo SNP A. Los frutos tienen semillas y pulpa roja, que son comercializables.
- 15 Tabla 1 - Marcadores SNP vinculados a *cyv_3.1* y localización SNP en el cromosoma 3 del genoma de la sandía cultivada publicado en la web mundial icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi bajo "Watermelon: Genome", "Watermelon genome (97103) - version 1"

Nombre del marcador SNP	introgresión <i>cyv_3.1/cyv_3.1</i> de <i>C. lanatus</i> ssp. <i>mucosospermus</i>	<i>cyv_3.1/cyv_3.1</i> introgresión de <i>C. lanatus</i> ssp. <i>lanatus</i>	variedad n de sandía sin <i>cyv_3.1</i> (WT/WT)	Secuencia genómica (dirección 5'a 3') que comprende el SNP en el nucleótido 76 de la secuencia, y localización física del SNP en el cromosoma 3 de la sandía cultivada (*)
SNP_01	GG	AA	GG	GGGGCGAATAAAATAAAATA AATAAATTTGGTAGGGTTGG AGTGAATAAAGGAGATTTT ATTTTATTTGGTTGA[A/G]* GAAACAAAAGGGGAAAAATT GGAATTAAGGGTTTAAGGAG
				GGAGAGGAATTAGGGTTTAG TTTAATCCCACCCTC (SEQ ID NO: 1) *Localizado en el nucleótido 7.586.752
SNP_02	GG	GG	AA	TCAGTCATAGTATAGTGGA TATTTGACTGCAGGTATAAG ACTCAACTTCAGAAAGATCC AGACCTTTTTTTTAA[A/G]* AGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGAGAGAACTAGAAACAACA ATTTCCACCAAAAAGAATGAA AAGAGACTAAGACTC (SEQ ID NO: 2)

Nombre del marcador SNP	introgresión <i>cyv_3.1/cyv_3.1</i> de <i>C. lanatus</i> ssp. <i>mucosospermus</i>	<i>cyv_3.1/cyv_3.1</i> introgresión de <i>C. lanatus</i> ssp. <i>lanatus</i>	variedad n de sandía sin <i>cyv_3.1</i> (WT/WT)	Secuencia genómica (dirección 5'a 3') que comprende el SNP en el nucleótido 76 de la secuencia, y localización física del SNP en el cromosoma 3 de la sandía cultivada (*)
				*Localizado en el nucleótido 7.664.093

5

(continuación)

Nombre del marcador SNP	introgresión <i>cyv_3.1/cyv_3.1</i> de <i>C. lanatus</i> ssp. <i>mucosospermus</i>	<i>cyv_3.1/cyv_3.1</i> introgresión de <i>C. lanatus</i> ssp. <i>lanatus</i>	variedad n de sandía sin <i>cyv_3.1</i> (WT/WT)	Secuencia genómica (dirección 5'a 3') que comprende el SNP en el nucleótido 76 de la secuencia, y localización física del SNP en el cromosoma 3 de la sandía cultivada (*)
SNP_03	CC	CC	TT	CGAGTTGGCTATTAGAGTTG ATCGTTGGAGATGATTGACT GAGTTAGTTGCTAGAGGTGG TCGTTGAGTTGGTTG[C/T]* CGAAGGTATTCGTCAGGGCT AGTTGCGAAGTTGGGCTTTG GAGAAGTGGAGATAGTCATT GTAGTTGATTGATGG (SEQ ID NO: 3) *Localizado en el nucleótido 7.693.225
Fenotipo	CVYV resistente	CVYV resistente	CVYV susceptible	
SNP haplotipo	Resistencia Haplotipo A: G-G-C para SNP_01, SNP_02 y SNP_03	Resistencia Haplotipo B: A-G-C para SNP_01, SNP_02 y SNP_03		

Plantas cultivadas diploides de sandía, semillas y partes de plantas, que comprenden *cyv_3.1*

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

- a) una Guanina (G) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o en el nucleótido 76 de una secuencia que comprende al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y

b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o en el nucleótido 76 de una secuencia que comprende al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3

y en donde el locus que confiere resistencia al CVYV se obtiene cruzando una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB42449, NCIMB42450 o NCIMB42666 con otra planta de sandía.

Así pues, la planta de sandía anterior comprende un fragmento de introgresión en el cromosoma 3 (que comprende *cyv_3.1*), que es detectable por el genotipo de resistencia de SNP_02 y SNP_03. Aunque SNP_02 y SNP_03 están estrechamente ligados al QTL, es posible generar fragmentos de introgresión que hayan perdido SNP_02 y/o SNP_03, pero que conserven el QTL y uno o más marcadores silvestres diferentes específicos del genoma de la sandía estrechamente ligados a *cyv_3.1*, aspecto que se describe en el presente documento, pero no de acuerdo con la invención. La contribución importante a la técnica es que el fragmento de introgresión comprende el locus de resistencia al CVYV denominado en el presente documento *cyv_3.1*. No es necesario que la planta sea fenotípicamente resistente al CVYV, ya que el locus de resistencia al CVYV puede estar en forma heterocigótica (sólo puede estar presente un cromosoma 3 recombinante). Así, el genotipo diploide para SNP_02 puede ser heterocigoto GA (Guanina/Adenina) u homocigoto GG (Guanina/Guanina) y el genotipo diploide para SNP_03 puede ser heterocigoto CT (Citosina/Timeína) u homocigoto CC (Citosina/Citosina). En otras palabras, una planta puede ser heterocigota para el fragmento de introgresión (y el QTL), teniendo sólo una Guanina (G) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02), o en un nucleótido correspondiente al nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 en una secuencia variante, es decir, en una secuencia que comprende al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, y sólo una citosina en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03), o en un nucleótido correspondiente al nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 en una secuencia variante, es decir, en una secuencia que comprende al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; o puede ser homocigoto para el fragmento de introgresión (y el QTL) que tiene dos guaninas en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o en un nucleótido correspondiente al nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 en una secuencia variante, es decir, en una secuencia que comprende al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y que tiene dos citosinas (C) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o en un nucleótido correspondiente al nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 en una secuencia variante, es decir, en una secuencia que comprende al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

En un aspecto, el fragmento de introgresión está en forma homocigótica, y el fragmento de introgresión que comprende el locus CVYV *cyv_3.1* está en forma homocigótica, por lo que la planta es resistente al CVYV, como puede determinarse, por ejemplo, en un ensayo de resistencia al CVYV y/o un ensayo de marcadores moleculares. Así, en un aspecto, el SNP_02 y el SNP_03 son homocigóticos, es decir, el SNP_02 y el SNP_03 tienen el genotipo de resistencia GG y CC, respectivamente, y la planta es resistente al CVYV, por ejemplo, cuando se prueba en un ensayo de resistencia al CVYV y, preferentemente, también cuando se cultiva en el campo o en túnel bajo la presión natural del CVYV.

Así, en un aspecto, dicho fragmento de introgresión es detectable por un marcador seleccionado del grupo que consiste en:

a) un genotipo diploide GG (Guanina/Guanina) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o

b) un genotipo diploide CC (Citosina/Citosina) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

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

La planta anterior es, por tanto, también resistente al CVYV en su fenotipo, como puede determinarse en un ensayo de resistencia al CVYV como, por ejemplo, se describe en los Ejemplos, o en el campo o túnel en zonas donde el CVYV se da de forma natural. Se entiende que en un ensayo de resistencia al CVYV se examina una pluralidad de plantas (por ejemplo, al menos 10, 11, 12, 13, 14 o más) de la línea o variedad, preferentemente en varias repeticiones

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

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

a) una Guanina (G) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o

b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

La planta comprende el locus de resistencia CVYV en forma homocigótica o heterocigótica.

En un aspecto, la planta comprende el fragmento de introgresión en forma homocigótica, como se establece en las reivindicaciones adjuntas, es decir, el fragmento de introgresión es detectable por (o comprende):

a) un genotipo diploide GG (Guanina/Guanina) para el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o

b) un genotipo diploide CC (Citosina/Citosina) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

Las plantas diploides anteriores pueden, en una realización, tener el haplotipo SNP A o el haplotipo SNP B. Así, en un aspecto las plantas comprenden el haplotipo SNP A que tiene G-G-C para SNP_01 - SNP_02 y SNP_03, respectivamente (por ejemplo, en forma diploide el haplotipo SNP A es GG-GG-CC en forma homocigota, o GG-GA-CT en forma heterocigota). En otro aspecto, la planta comprende el haplotipo SNP B que tiene A-G-C para SNP_01 - SNP_02 y SNP_03, respectivamente (por ejemplo, en forma diploide el haplotipo SNP A es AA-GG-CC en forma homocigota, o AG-GA-CT en forma heterocigota). Así, en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 1 (SNP_01) o de una secuencia que comprenda al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:1, el genotipo SNP puede ser una Guanina o una Adenina. SNP_01 puede distinguir los dos haplotipos de resistencia diferentes.

Cualquiera de las plantas diploides de sandía descritas anteriormente puede ser de cualquier tipo, es decir, el locus de resistencia *cyv_3.1* puede introducirse en cualquier sandía cultivada para producir líneas o variedades que comprendan el locus CVYV. Las sandías cultivadas producen frutos de diversos tamaños (por ejemplo, muy pequeños, como se describe en el documento WO2012069539 por ejemplo, inferior a 0,9 kg o incluso igual o inferior a 0,65 kg; tamaño personal de aproximadamente 3-7 libras, es decir, de aproximadamente 1,4 a 3,2 kg; tamaños de nevera de aproximadamente 6-12 libras, es decir, de aproximadamente 2,7 a 5,5 kg; y tamaños más grandes de hasta 35 libras, es decir, de aproximadamente 15,9 kg), colores de pulpa de fruta y formas de fruta y con diferentes colores de corteza. Por lo tanto, el locus *cyv_3.1* puede introducirse en sandías cultivadas que produzcan cualquier forma de fruto (por ejemplo, alargado, ovalado, ovalado alargado, en bloque, en bloque alargado, esférico o redondo), superficie del fruto (por ejemplo, surcada, lisa), color de la pulpa (por ejemplo, rojo, rojo oscuro, rojo escarlata, rojo coral, naranja, salmón o rosa, amarillo, amarillo canario o blanco), color de la corteza (por ejemplo, verde claro, verde oscuro, verde con rayas estrechas, medianas o anchas, tipos grises, con o sin manchas, amarillo dorado, corteza tipo Crimson, corteza tipo Jubilee, corteza tipo Allsweet, etc.), verde claro; verde oscuro; verde rayado con rayas estrechas, medias o anchas; tipos grises; con o sin manchas; amarillo dorado; corteza tipo Crimson, corteza tipo Jubilee; corteza tipo Allsweet; negro/verde oscuro), grosor de la corteza, dureza de la corteza, dibujo de la corteza (por ejemplo, rayado, no rayado, en red), estructura de la pulpa / firmeza de la pulpa, contenido en licopeno y/o vitaminas, diferentes relaciones azúcar/ácido, muy buen sabor de la fruta, etc. mediante mejora genética. Véase Guner y Wehner 2004, Hort Science 39(6): 1175-1182 en particular las páginas 1180-1181, en las que se describen los genes de las características de los frutos. Por lo general, los objetivos de selección más importantes son la precocidad, el alto rendimiento de la fruta, la alta calidad interna de la fruta (buen color uniforme, alto contenido de azúcar, proporción adecuada de azúcar y acidez, buen sabor, alto contenido de vitaminas y licopeno, textura firme de la pulpa, textura no fibrosa de la pulpa, 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).

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

En un aspecto, el brix promedio es de al menos 6,0, 7,0, 8,0 o al menos 9,0, preferentemente al menos 10,0, más preferentemente al menos 11,0 o más.

- 5 El color de la fruta puede ser cualquier color, tal como rojo, rojo oscuro, rojo escarlata, rojo coral, naranja, salmón, rosa, rojo rosado, amarillo, amarillo canario o blanco. Preferentemente, el color de la pulpa de la fruta es uniforme.

10 El diploide puede ser una línea endocriada o un híbrido diploide, producido por el cruce de dos líneas endocriadas. En un aspecto, ambas líneas parentales endocriadas son homocigóticas para el *cyv_3.1*, de modo que el híbrido también es homocigótico. La planta diploide puede ser una línea endocriada, una variedad, un híbrido diploide F1, una variedad OP (de polinización abierta), una planta polinizadora, (por ejemplo, una polinizadora dedicada que produce frutos comercializables como se describe en el documento WO2012069539), o cualquier otro diploide cultivado, incluyendo cualquier planta propagada clonalmente. Dado que el fenotipo de resistencia al CVYV se expresa preferentemente de forma fenotípica, el fragmento de introgresión es en un aspecto homocigótico en el diploide, al igual que uno o más de los marcadores vinculados a *cyv_3.1*.

15 El fragmento de introgresión de sandía silvestre que comprende *cyv_3.1* puede ser de varios tamaños, por ejemplo, aproximadamente 15 Mb o menos, aproximadamente 10 Mb o menos, aproximadamente 9 Mb o menos, aproximadamente 8 Mb o menos, aproximadamente 7 Mb o menos, aproximadamente 6 Mb o menos, aproximadamente 5 Mb o menos, aproximadamente 4 Mb o menos, aproximadamente 3 Mb o menos, aproximadamente 2,5 Mb o 2 Mb o menos, aproximadamente 1 Mb (equivale a 1.000.000 de pares de bases) o menos, o aproximadamente 0,5 Mb (equivale a 500.000 pares de bases) o menos, tal como aproximadamente 200.000 pb (equivale a 200 kilopares de bases) o menos, aproximadamente 100.000 pb (100 kb) o menos, aproximadamente 50.000 pb (50 kb) o menos, aproximadamente 30.000 pb (30 kb) o menos. En general, se prefieren los fragmentos de introgresión más pequeños, ya que los rasgos negativos pueden localizarse en el mismo fragmento. El tamaño de un fragmento de introgresión puede reducirse mediante recombinación meiótica (por ejemplo, autofecundando la planta) y seleccionando plantas progenitoras recombinantes que tengan un fragmento de introgresión más pequeño pero que conserven *cyv_3.1*, utilizando, por ejemplo, un ensayo fenotípico y/o un ensayo de marcadores moleculares como se describe en el presente documento. Si el SNP_01 y/o el SNP_02 y/o el SNP_03 se pierden por recombinación, pero la planta conserva el locus *cyv_3.1*, puede utilizarse la selección fenotípica para seleccionar una planta que conserve *cyv_3.1* y/o el fragmento de introgresión puede detectarse utilizando otro procedimiento, por ejemplo, secuenciando la región del cromosoma 3 donde se encuentra el QTL (por ejemplo, la región entre aproximadamente 2,50 Mb y aproximadamente 12,8 Mb del cromosoma 3, ver Figura 1) u otros marcadores específicos del genoma de la sandía silvestre vinculados al *cyv_3.1*. Esos otros marcadores específicos del genoma de la sandía silvestre pueden desarrollarse utilizando procedimientos conocidos por el experto, tal como el mapeo fino, la secuenciación, etc.

20 En un aspecto, el fragmento de introgresión de la invención (que comprende *cyv_3.1* o una variante del mismo y en donde el fragmento de introgresión se introgrese a partir de una planta de sandía silvestre, como se establece en las reivindicaciones anexas) es un fragmento que comprende (o abarca) la región que comienza en 2,50 Mb y termina en 12,80 Mb del cromosoma 3 y comprende el locus *cyv_3.1* o una variante del mismo.

25 En otro aspecto, el fragmento de introgresión de la invención (que comprende *cyv_3.1* o una variante del mismo y en donde el fragmento de introgresión se introgrese a partir de una planta de sandía silvestre, tal como se establece en las reivindicaciones anexas) es un fragmento que comprende un fragmento más pequeño (parte) de la región que comienza en 2,50 Mb y que termina en 12,80 Mb del cromosoma 3, por ejemplo, que tiene un tamaño de, por ejemplo, 9Mb, 8Mb, 7Mb, 6Mb, 5Mb, 4Mb, 3Mb, 2Mb, 1Mb, 0,5Mb, 100kb, 50kb, 35kb, 30kb, 20kb, o menos (como se ha descrito anteriormente) y que comprende el locus *cyv_3.1* o una variante del mismo. La pieza tiene un tamaño mínimo de 5kb, 10kb, 20kb o más.

30 En otro aspecto más, el fragmento de introgresión de la invención (que comprende *cyv_3.1* o una variante del mismo y en donde el fragmento de introgresión se introgrese a partir de una planta de sandía silvestre, tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas) consiste en un fragmento más pequeño (subfragmento) de la región que comienza en 2,50 Mb y que termina en 12,80 Mb del cromosoma 3, por ejemplo con un tamaño de, por ejemplo, 9Mb, 8Mb, 7Mb, 6Mb, 5Mb, 4Mb, 3Mb, 2Mb, 1Mb, 0,5Mb, 100kb, 50kb, 35kb, 30kb, 20kb, o menos (como se ha descrito anteriormente) y que comprende el locus *cyv_3.1* o una variante del mismo. La pieza tiene un tamaño mínimo de 5kb, 10kb, 20kb o más.

35 En otro aspecto más, el fragmento de introgresión de la invención (que comprende *cyv_3.1* o una variante del mismo y en donde el fragmento de introgresión se introgrese a partir de una planta de sandía silvestre, como se establece en las reivindicaciones anexas) comprende la región que comienza en 7,50 Mb y termina en 7,75 Mb del cromosoma 3, o la región que comienza en 7,60 Mb y termina en 7,70 Mb, en donde el fragmento comprende el locus *cyv_3.1* o una variante del mismo. La pieza tiene un tamaño mínimo de 5kb, 10kb, 20kb o más.

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

45 Asimismo, las partes vegetales de las plantas de la invención, tal como se establecen en las reivindicaciones anexas,

están incluidas en el presente documento, tales como células, raíces, hojas, frutos, partes de frutos, polen, óvulos, flores, portainjertos, vástagos, esquejes, tallos, ADN extraído de dichas partes o células, etc. Dichas partes de la planta comprenden en su genoma al menos un cromosoma recombinante 3 que comprende el fragmento de introgresión, detectable mediante uno o más marcadores según se describe. Asimismo, el ADN genómico extraído de dichas células o partes de plantas comprende en su genoma al menos un cromosoma recombinante 3 que comprende el fragmento de introgresión, detectable mediante uno o más marcadores según se ha descrito.

La fuente de resistencia al CVYV de *C. lanatus* ssp. *mucosospermus* fue una accesión silvestre obtenida de la colección GRIN de Estados Unidos. Tiene frutos pequeños (aproximadamente 13 cm x 13 cm) de pulpa blanca con un brix de aproximadamente 3,0. La accesión *C. lanatus* ssp. *lanatus* también era una accesión silvestre obtenida de la colección GRIN de EE.UU. Tenía frutos amargos amarillos de aproximadamente 16 cm x 24 cm, con un brix inferior a 3,0.

La resistencia *cyv_3.1* se retrocruzó a partir de estas dos accesiones silvestres diploides en líneas élite de sandía susceptibles al CVYV, generando así sandía cultivada diploide que comprendía *cyv_3.1* y era resistente al CVYV, cuando el fragmento de introgresión estaba presente en forma homocigótica.

Como se ha mencionado anteriormente, se han depositado en el NCIMB, semillas de dos líneas diploides endocriadas cultivadas de sandía que comprenden *cyv_3.1* en forma homocigótica con los números de acceso NCIMB42449 y NCIMB42450. Estas dos líneas comprenden SNP_02 y SNP_03 en forma homocigota y tienen el haplotipo B del SNP. Los frutos tienen semillas, pulpa roja y un brix de 11,0, por lo que son frutos comercializables. Las plantas son resistentes al CVYV, pero susceptibles al ZYMV (y también carecen del marcador *eIF4E* de Ling et al. 2008 *supra*). Una de las líneas tiene frutos con corteza Crimson sweet, la otra frutos con corteza Jubilee. El *cyv_3.1* puede transferirse de estas dos líneas a cualquier otra línea o variedad de sandía cultivada mediante mejora tradicional, utilizando selección fenotípica o selección con marcadores, o ambas.

También semillas de otra línea endocriada diploide de élite que comprende *cyv_3.1* en forma homocigota han sido depositadas por Nunhems B.V. en el NCIMB bajo el número de acceso NCIMB 42666. Esta línea comprende SNP_02 y SNP_03 en forma homocigota y tiene el haplotipo SNP A. Los frutos tienen semillas y pulpa roja, que son comercializables. Las plantas son resistentes al CVYV.

Como se establece en las reivindicaciones anexas, el *cyv_3.1* puede obtenerse a partir de (puede obtenerse a partir de / está presente en) semillas depositadas bajo NCIMB42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666, por ejemplo, cruzando plantas cultivadas a partir de dichas semillas (o su progenie) con otra planta de sandía y seleccionando la progenie que comprende el fragmento de introgresión. En un aspecto, la otra planta de sandía es una sandía cultivada que carece de *cyv_3.1*.

Alternativamente, otras accesiones silvestres de *C. lanatus* ssp. *mucosospermus* o de *C. lanatus* ssp. *lanatus* pueden comprender *cyv_3.1* (o una variante del mismo) y pueden utilizarse para introgresar *cyv_3.1* (o una variante del mismo) en sandías cultivadas. Para identificar esas otras accesiones silvestres se pueden utilizar uno o más de los marcadores proporcionados en el presente documento, opcionalmente en combinación con ensayos de resistencia al CVYV. Por ejemplo, se encontró que las semillas de la accesión de sandía silvestre PI189318 contenían *cyv_3.1*, como se muestra en el Ejemplo 6, cuando se seleccionó la progenie de accesiones de sandía silvestre de la colección GRIN de EE.UU. utilizando los marcadores SNP proporcionados en el presente documento. PI189318 produce frutos duros de pulpa blanca, amargos y con un brix muy bajo (alrededor de 3,0). El locus *cyv_3.1* puede introgresarse a partir de esta u otras accesiones silvestres de sandía en sandías cultivadas, tal como se describe en el presente documento, utilizando opcionalmente uno o más de los marcadores SNP que se proporcionan en el presente documento. Así, en un aspecto, la planta de sandía cultivada de la invención comprende un fragmento de introgresión de, por ejemplo, PI189318 o progenie de la misma, o de otras sandías silvestres, por lo que el fragmento de introgresión comprende el locus de resistencia *cyv_3.1* y es detectable por uno o más marcadores ligados a *cyv_3.1* como se describe en el presente documento. Las sandías silvestres pueden tener el haplotipo SNP A o B. Por ejemplo, PI189318 tiene el haplotipo SNP A en forma homocigota.

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

- a) una Guanina (G) en el nucleótido 7.664.093 del cromosoma 3 del genoma de la sandía cultivada (SNP_02); y
- b) una citosina (C) en el nucleótido 7.693.225 del cromosoma 3 del genoma de la sandía cultivada (SNP_03) y en donde el locus que confiere resistencia al CVYV puede obtenerse cruzando una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB42449, NCIMB42450 o NCIMB42666 con otra planta de sandía.

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

a) una Guanina (G) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y

b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 y en donde el locus que confiere resistencia al CVYV se obtiene cruzando una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB42449, NCIMB42450 o NCIMB42666 con otra planta de sandía.

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

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

También se incluyen en el presente documento, partes de plantas, tales como frutos o partes de los mismos, células, hojas, flores, etc. de las plantas mencionadas. Como ya se ha mencionado, los frutos son diploides comercializables.

En una realización, la planta de sandía cultivada o la parte de la planta que comprende el locus que confiere resistencia al CVYV tal como se encuentra en las semillas depositadas bajo los números de acceso NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666 o tal como se encuentra en la sandía silvestre PI189318 u otras sandías silvestres. Así, en un aspecto, el *cyv_3.1* puede obtenerse cruzando una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB42449 o NCIMB42450 o NCIMB42666, o la progenie de cualquiera de estas plantas (por ejemplo, obtenida por autofecundación y/o cruzamiento y cuya progenie conserva el *cyv_3.1*), con otra planta de sandía, por ejemplo, una línea o variedad de élite de sandía cultivada. En otro aspecto, el gen *cyv_3.1* puede obtenerse por introgresión de la resistencia de sandías silvestres, como PI189318 u otras sandías silvestres, en sandías cultivadas.

En otro aspecto, la planta de sandía cultivada o la parte de la planta que comprende el fragmento de introgresión que confiere resistencia al CVYV tal como se encuentra en las semillas depositadas con los números de acceso NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666, o una parte más corta de las mismas, que conserva *cyv_3.1*. Así, en un aspecto, el fragmento de introgresión que comprende *cyv_3.1* puede obtenerse cruzando una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB42449 o NCIMB42450 o NCIMB42666, o la progenie de cualquiera de estas plantas (por ejemplo, obtenida por autofecundación y/o cruzamiento y cuya progenie conserva el *cyv_3.1*), con otra planta de sandía.

Así pues, el gen de resistencia al CVYV en el cromosoma 3 es, en un aspecto, el gen tal como está presente en las semillas depositadas con el número de acceso NCIMB42449 o NCIMB42450 o NCIMB42666, o su progenie, pero puede ser igualmente el gen de resistencia de otra sandía silvestre, especialmente una sandía silvestre que comprenda uno o más de los marcadores SNP, es decir, el genotipo de resistencia de los marcadores SNP, ligado al *cyv_3.1*. Algunos ejemplos son las accesiones silvestres como PI189318 u otras. Además del análisis de marcadores o como alternativa, por ejemplo, el experto puede realizar fácilmente una prueba de alelismo para determinar si dicha resistencia al CVYV está conferida efectivamente por el mismo gen de resistencia, es decir, *cyv_3.1*. Asimismo, pueden utilizarse otros procedimientos o combinaciones de procedimientos, tal como el mapeo, el mapeo fino, la secuenciación, la herencia genética y similares para confirmar que el mismo gen, *cyv_3.1*, es responsable del fenotipo de resistencia al CVYV.

Combinación, que confiere *cyv_3.1*, de la resistencia al CVYV con la resistencia al ZYMV

Los inventores descubrieron que *cyv_3.1* está localizado en el mismo cromosoma que el gen recesivo *zym*, que confiere resistencia contra ZYMV. Por lo tanto, *cyv_3.1* puede combinarse con *zym* en el cromosoma 3 para proporcionar un cromosoma que comprenda los loci que confieren resistencia a CVYV y ZYMV en fase de acoplamiento.

El ZYMV es un virus transmitido por áfidos que puede causar deformaciones y decoloraciones de leves a graves en los frutos.

Las fuentes de resistencia *zym* son, por ejemplo, PI595203 descrito por Ling *et al.* 2008 (*supra*). Los inventores han convertido el marcador CAPS descrito por Ling *et al.* 2008 en un marcador SNP denominado SNP_04, véase la Tabla 2.

Tabla 2 - Marcador SNP en el gen *eIF4E* vinculado a la resistencia al ZYMV y localización del SNP en el cromosoma 3 del genoma de la sandía cultivada publicado en la web mundial icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi bajo "Watermelon: Genome", "Watermelon genome (97103) - version 1"

Nombre del marcador SNP	Sandía con introgresión <i>zym/zym</i> de, por ejemplo, PI595203	Variedad de sandía sin <i>zym/zym</i>	Secuencia genómica (dirección 5'a 3') que comprende el SNP en el nucleótido 70 de la secuencia, y localización física del SNP en el cromosoma 3 de la sandía cultivada (*)
SNP_04	GG	TT	TGAAGTTCTACCTCCAAAAC TCCTCAACAGTAGAGAAGGT ATAGATCGGTCGGATAGACG CACCCCAGG[G/T]*GGCTT GCTTAGACTTGGCGGATGGG TTATCGAACC AAAAGGTCCA AGAGTGCTCAAGAGGGTGAG GCTGATGCACTATCGCCGCC GACAAATTGGACGAGTCAAG GTCGTCTCTCCGACGATCT CTCCTTCCTCAAGTTCCTCA TCTTCATCACCGCCTCGTCC
			TCTAGGGTTTTGATTTGCAA TGGTATTAGAAAGATCTTCC GTGGATGTAGCTTTGATCGT CTCTTCGACTACCATTTTCC TTTCACTACTTGTGGAATTG AGCGT (SEQ ID NO: 4) *Localizado en el nucleótido 7.767.975
Fenotipo	ZYMV resistente	ZYMV susceptible	

5

Las plantas diploides de sandía de la invención, tal como se establece en las reivindicaciones anexas y se ha descrito anteriormente, pueden, por lo tanto, comprender además el gen *zym* en el cromosoma 3.

10

Opcionalmente, la presencia de (un fragmento de introgresión que comprende) el gen *zym* es mediante la detección de una Guanina (G) en el nucleótido 70 de SEQ ID NO: 4 (SNP_04) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4. Sin embargo, es probable que el SNP_04 no esté muy estrechamente ligado con *zym*, por lo que puede ser preferible la selección fenotípica o el desarrollo de un marcador más estrechamente enlazado para garantizar la presencia de *zym*.

15

El cromosoma recombinante 3, por lo tanto, comprende el fragmento de introgresión que comprende el locus de resistencia al CVYV *cyv_3.1* y puede comprender además (un fragmento de introgresión que comprende) el

gen *zym* en el mismo cromosoma. No es necesario que la planta sea fenotípicamente resistente al CVYV y resistente al ZYMV, ya que el locus de resistencia al CVYV y el gen *zym* pueden estar en forma heterocigótica (sólo puede estar presente un cromosoma 3 recombinante). En el presente documento se describe la planta que es homocigótica para el cromosoma recombinante 3 y, por tanto, resistente tanto al CVYV como al ZYMV.

Así, en un aspecto divulgado en el presente documento, el fragmento de introgresión que comprende el locus de resistencia a CVYV *cyv_3.1* está en forma homocigótica, y el (fragmento de introgresión que comprende) gen *zym* está en forma homocigótica, por lo que la planta es resistente a CVYV y ZYMV. En un aspecto divulgado en el presente documento, el SNP_02 y/o el SNP_03 y/o el marcador o marcadores específicos del genoma de la sandía silvestre ligados a *cyv_3.1* son homocigóticos y *zym* es homocigótico (*zym/zym*), y opcionalmente el SNP_04 (si está presente) es homocigótico GG (Guanina/Guanina).

También se describe en el presente documento (semilla de) una planta de sandía cultivada diploide de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*, en donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3 que comprende un locus que confiere resistencia al CVYV denominado *cyv_3.1*, en donde dicho fragmento de introgresión es detectable por (o comprende):

a) una Guanina (G) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y

b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y

c) en donde el cromosoma 3 comprende además el gen *zym*.

En un aspecto descrito en el presente documento, la planta comprende el fragmento de introgresión en el cromosoma 3 en forma homocigótica, es decir, el fragmento de introgresión es detectable por (o comprende):

a) un genotipo diploide GG (Guanina/Guanina) para el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y

b) un genotipo diploide CC (Citosina/Citosina) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y

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

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

Las plantas diploides anteriores pueden tener el haplotipo A del SNP CVYV o el haplotipo B del SNP combinado con el gen *zym*. Así, en un aspecto, las plantas descritas en el presente documento comprenden el haplotipo SNP A que tiene G-G-C para SNP_01 y SNP_02 y SNP_03, respectivamente (por ejemplo, en forma diploide el haplotipo SNP A es GG-GG-CC en forma homocigota o GG-GA-CT en forma heterocigota) y el gen *zym* ligado en el mismo cromosoma que *cyv_3.1* (y opcionalmente SNP_04 tiene el genotipo diploide GT, heterocigota, o GG, homocigota). En otro aspecto, la planta descrita en el presente documento comprende el haplotipo SNP B que tiene A-G-C para SNP_01 y SNP_02 y SNP_03, respectivamente (por ejemplo, en forma diploide el haplotipo SNP A es AA-GG-CC en forma homocigótica o AG-GA-CT en forma heterocigótica) y el gen *zym* ligado en el mismo cromosoma que *cyv_3.1* (y opcionalmente SNP_04 tiene el genotipo diploide GT, heterocigótico, o GG, homocigótico). Así, en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 1 (SNP_01) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, el genotipo SNP puede ser una Guanina o una Adenina. El SNP_01 puede distinguir los dos haplotipos diferentes de resistencia al CVYV, pero cualquiera de ellos puede combinarse con el gen *zym* en el mismo cromosoma 3.

Así pues, una planta diploide resistente al CVYV y al ZYMV puede comprender uno de los dos genotipos siguientes:

Marcador SNP y gen en el cromosoma 3	Genotipo SNP diploide	Genotipo SNP diploide
SNP_01	GG	AA
SNP_02	GG	GG
SNP_03	CC	CC
<i>gen</i>	<i>zym/zym</i>	<i>zym/zym</i>
Opcionalmente SNP_04	GG	GG

Para combinar el locus de resistencia CVYV *cyv_3.1* con el gen *zym*, el experto cruzará una planta de la invención, que comprende *cyv_3.1*, con una planta que comprende el gen *zym* y seleccionará una planta progenie recombinante que comprende tanto el locus CVYV *cyv_3.1* como el gen *zym* en un cromosoma 3 recombinante.

En un aspecto, la planta de sandía cultivada o la parte de la planta que comprende el locus *cyv* 3.1 que confiere resistencia al CVYV tal como se encuentra en las semillas depositadas con los números de acceso NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666 y que comprende además el gen *zym* se describe en el presente documento.

En un aspecto, la planta de sandía cultivada o parte de la planta que comprende el fragmento de introgresión (que comprende *cyv* 3.1) tal como se encuentra en las semillas depositadas bajo los números de acceso NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666, o un fragmento más pequeño del mismo (que retiene el locus *cyv* 3.1) y comprende además el gen *zym* se describe en el presente documento.

En un aspecto, las plantas diploides de sandía (y las semillas a partir de las cuales pueden cultivarse las plantas) de acuerdo con la invención son líneas endocriadas, producidas por autofecundación varias veces.

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

Las plantas cultivadas a partir de las semillas depositadas también se sometieron a pruebas de resistencia al CGMMV (virus del moteado verde del pepino), pero fueron susceptibles, lo que indica que *cyv*_3.1 no confiere resistencia al CGMMV.

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

La producción de sandías triploides sin semillas implica el uso de polen de plantas parentales macho diploides para fertilizar flores de plantas parentales maternas tetraploides ($2n = 4x = 44$). La polinización de las flores tetraploides con polen diploide da lugar a semillas F1 que son triploides (Kihara, 1951, Proceedings of American Society for Horticultural Science 58: 217-230; Eigsti 1971, Hort Science 6: 1-2). Las plantas híbridas triploides, cultivadas a partir de estas semillas F1, son autointériles, ya que producen polen estéril debido al 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 interplantan con plantas polinizadoras para la producción de fruta. Los frutos "sin semillas" producidos tras la polinización en la planta híbrida triploide a menudo no son realmente sin semillas, pero pueden contener algunas semillas no desarrolladas, pequeñas y pálidas, que son comestibles.

Así, para producir tales variedades triploides sin semillas, se cruzan una línea parental femenina tetraploide (preferentemente una línea endocriada) y una línea parental masculina diploide (preferentemente una línea endocriada). Las semillas producidas en los frutos del progenitor tetraploide mediante polinización cruzada son triploides, con dos juegos cromosómicos de la madre tetraploide y un juego cromosómico del padre diploide. Estas semillas se cosechan y se venden como variedades triploides. Las plantas triploides cultivadas a partir de estas semillas siguen necesitando polen para inducir la fructificación (proporcionado por un polinizador), pero los frutos producidos son sandías sin semillas.

En un aspecto, se proporciona una planta de sandía tetraploide que comprende cuatro cromosomas recombinantes 3, tal como se establece en las reivindicaciones anexas, es decir, cada uno de los cuales comprende el fragmento de introgresión de una sandía silvestre que comprende *cyv* _3.1. Así, la planta tetraploide comprende cuatro copias de *cyv* _3.1. Cuando se cruza con una línea parental diploide masculina que comprende dos copias de *cyv* _3.1, las semillas triploides resultantes comprenden tres copias de *cyv*_3.1.

Para hacer tal planta tetraploide, cualquiera de las plantas diploides resistentes al CVYV descritas anteriormente, que son homocigóticas para el fragmento de introgresión, puede utilizarse como material de partida para generar plantas tetraploides. Las técnicas de duplicación cromosómica conocidas por el experto pueden utilizarse para generar una planta tetraploide a partir de dichas plantas diploides. Por ejemplo, Noh et al. (2012) Hort. Environ. Biotechnol. 53(6):521-529 se evaluaron diferentes procedimientos de generación de sandías tetraploides. En todos los procedimientos se utiliza un agente antimitótico, tal como la colchicina, la dinitoalanina o la orizalina, para inducir la duplicación cromosómica. Opcionalmente, puede utilizarse el cultivo de tejidos para generar plantas tetraploides a partir de partes de plantas. Para verificar que las plantas son tetraploides se puede confirmar el número de cromosomas. La ploidía puede determinarse fácilmente mediante recuento cromosómico o citometría de flujo u otros procedimientos conocidos (Sari et al. 1999, Scientia Horticulturae 82: 265 - 277).

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

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

a) una Guanina (G) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o

b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

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

Así, en una realización, la planta de sandía tetraploide anterior comprende:

a) un genotipo tetraploide GGGG (Guanina/Guanina/Guanina/Guanina) para el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y

b) un genotipo tetraploide CCCC (citosina/citosina/citosina/citosina) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

El genotipado de plantas tetraploides o partes de plantas (células, hojas, ADN, etc.) puede realizarse de la misma manera que para diploides, utilizando por ejemplo un ensayo KASP para distinguir genotipos SNP, por ejemplo, plantas o partes que comprenden GGGG para SNP_02 pueden distinguirse de plantas o partes que comprenden GGGA, GGAA, GAAA o AAAA para SNP_02 en su genoma.

Como el tetraploide se obtiene duplicando los cromosomas de un diploide resistente al CVYV descrito más arriba, los aspectos descritos para el diploide se aplican también al tetraploide. Por ejemplo, el tetraploide también puede comprender el gen *zym* en fase de acoplamiento en el cromosoma recombinante 3 y, por tanto, puede comprender cuatro copias de *cyv_3.1* (o una variante del mismo) y cuatro copias de *zym*. Asimismo, el haplotipo A o el haplotipo B pueden estar presentes en cuatro copias.

Así, a partir de los diploides anteriores se pueden derivar los siguientes tetraploides:

Marcador SNP y gen en el cromosoma 3	Genotipo SNP diploide → genotipo SNP tetraploide	Genotipo SNP diploide4 Genotipo SNP tetraploide
SNP_01	GG → GGGG	AA → AAAA
SNP_02	GG → GGGG	GG → GGGG
SNP_03	CC4 CCCC	CC → CCCC
Opcionalmente gen <i>zym</i>	<i>zym/zym</i> → <i>zym/zym/zym/zym</i>	<i>zym/zym</i> → <i>zym/zym/zym/zym</i>
Opcionalmente SNP_04	GG → GGGG	GG → GGGG

El tetraploide resistente al CVYV se autofecunda preferentemente varias veces, para producir un tetraploide endogámico, que puede utilizarse como parental femenino en la producción de semillas triploides.

En un aspecto, las plantas diploides resistentes al CVYV cuyas semillas se depositaron con los números de acceso NCIMB 42449 y NCIMB 42450, o su progenie (por ejemplo, que comprende un fragmento de introgresión más pequeño) se utilizan para hacer tetraploides. Estas plantas no contienen el gen *zym* y son susceptibles al ZYMV.

En un aspecto, las plantas diploides resistentes al CVYV cuyas semillas se depositaron con los números de acceso NCIMB 42666, o su progenie (por ejemplo, que comprende un fragmento de introgresión más pequeño) se utilizan para hacer tetraploides.

En otro aspecto, una planta de sandía cultivada que comprende un gen *cyv_3.1* de una sandía silvestre diferente, tal como de PI189318 u otros, se utiliza para hacer una planta tetraploide resistente al CVYV.

Además, las plantas que comprenden tanto *cyv_3.1* (o una variante) como el gen *zym* pueden utilizarse para hacer tetraploides. El *cyv_3.1* (o una variante del mismo) puede combinarse fácilmente con el gen *zym*, como por ejemplo el que se encuentra en PI595203, mediante técnicas tradicionales de cría y seleccionando recombinantes, opcionalmente con la ayuda de marcadores descritos en el presente documento, que comprendan tanto el *cyv_3.1* como el *zym* en el cromosoma 3. PI595203 está disponible en el USDA, ARS, National Genetic Resources Program, Germplasm Resources Information Network - (GRIN).

Por lo tanto, en un aspecto se describe en el presente documento una planta de sandía tetraploide (y semilla a partir de la cual puede cultivarse la planta), que comprende el locus que confiere resistencia al CVYV tal como se encuentra

en NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB42666 o en PI189318 u otras sandías silvestres y opcionalmente comprende el gen *zym* .

En un aspecto, las plantas de sandía tetraploides (y las semillas a partir de las cuales pueden cultivarse las plantas) de acuerdo con la invención son líneas endocriadas, producidas por autofecundación varias veces. En un aspecto, las plantas son adecuadas como líneas parentales para la producción de semillas triploides, descritas a continuación.

Las semillas a partir de las cuales pueden cultivarse dichas plantas tetraploides están incluidas en el presente documento. También se incluyen partes de plantas tetraploides de acuerdo con la invención, tales como células, polen, flores, frutos, hojas, tallos, etc. Los frutos son preferentemente frutos comercializables. El brix es preferentemente al menos 6,0, 7,0, 8,0 o al menos 9,0, preferentemente al menos 10,0, más preferentemente al menos 11,0 o más. El color de la fruta puede ser cualquiera, tal como rojo, rojo oscuro, rojo escarlata, rojo coral, naranja, salmón, rosa, rojo rosado, amarillo, amarillo canario o blanco. Preferentemente, el color de la pulpa de la fruta es uniforme.

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

Las plantas tetraploides pueden autofecundarse una o más veces, pero también pueden cruzarse con otra planta tetraploide de sandía. Si esa otra planta de sandía tetraploide carece de *cyv_3.1*, la F1 producida por el cruce contiene sólo dos copias de *cyv_3.1*. Si dicha planta se cruza de nuevo con una planta tetraploide que carece de *cyv_3.1*, se puede generar una progenie con una sola copia de *cyv_3.1*. Del mismo modo, si una planta de este tipo se autofecunda, puede generarse progenie con una o tres copias de *cyv_3.1*. Por lo tanto, una sandía tetraploide que comprenda 3, 2 o sólo 1 copia de *cyv_3.1* también se engloba en el presente documento.

Plantas triploides cultivadas de sandía y partes de plantas que comprenden *cyv_3.1* (o una variante del mismo)

En un aspecto, la planta tetraploide resistente al CVYV descrita anteriormente se utiliza como progenitor femenino y se poliniza con polen de un progenitor masculino diploide resistente al CVYV (también como se ha descrito anteriormente) y se cosechan las semillas del cruce. Estas semillas son triploides, es decir, comprenden tres copias del locus *cyv_3.1* de la invención. Las plantas cultivadas a partir de estas semillas son resistentes al CVYV y producen frutos de sandía sin semillas (frutos triploides). Opcionalmente, las plantas también son resistentes al ZYMV, es decir, comprenden el gen *zym* .

Así, todos los aspectos descritos anteriormente para las plantas diploides y tetraploides de la invención se aplican a las semillas triploides y a las plantas cultivadas a partir de dichas semillas. Así, por ejemplo, en un aspecto el locus *cyv_3.1* es el locus *cyv_3.1* tal como se encuentra en las semillas depositadas bajo NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666. Pero también puede ser el gen *cyv_3.1* como el que se encuentra en las sandías silvestres, tal como PI189318 u otros. En otro aspecto, se incluye aquí el fragmento de introgresión (que comprende el locus *cyv_3.1*) tal como se encuentra en las semillas depositadas bajo NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666, o un fragmento más pequeño del mismo, cuyo fragmento más pequeño conserva el locus *cyv_3.1*. Pero también se incluyen otras variantes de *cyv_3.1*, por ejemplo, de otras accesiones silvestres de sandía.

Las semillas a partir de las cuales pueden cultivarse plantas triploides resistentes al CVYV constituyen una realización del presente documento, al igual que las partes de plantas cultivadas a partir de dichas semillas, así como los frutos de sandía sin semillas producidos por estas plantas.

Los frutos triploides sin semillas son preferentemente comercializables. Preferentemente tienen un brix medio de al menos 6,0, 7,0, 8,0 o preferentemente de al menos 9,0, preferentemente de al menos 10,0, más preferentemente de al menos 11,0.

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

El peso promedio del fruto de un híbrido triploide que comprende *cyv_3.1* (o una variante del mismo) en tres copias puede ser igual o superior a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 kg. En otra realización, el peso medio del fruto de un híbrido triploide que comprende *cyv_3.1* (o una variante del mismo) en tres copias puede ser igual o inferior a 5 kg, por ejemplo, 4, 3, 2, 1,5 o 1 kg, o incluso menos.

Los frutos sin semillas pueden tener cualquier forma (por ejemplo, alargada, ovalada, en bloques, esférica o redonda), superficie del fruto (surco, lisa), color de pulpa (rojo, rojo oscuro, rojo escarlata, rojo coral, naranja, salmón, rosa, rojo rosado), amarillo, amarillo canario o blanco), color de la corteza (por ejemplo, verde claro; verde oscuro; verde con rayas estrechas, medianas o anchas; tipos grises; con o sin manchas; amarillo dorado), espesor de la corteza, dureza de la corteza, patrón de la corteza (por ejemplo, rayado, no rayado, en red), estructura de la pulpa/firmeza de la pulpa, contenido de licopeno y/o vitaminas, diferentes proporciones de azúcar a ácido, sabor de la fruta, etc.

Por lo tanto, el locus *cyv_3.1* (o variante) que confiere resistencia al CVYV puede utilizarse para obtener una gama de variedades sin semillas, que producen frutos de diferentes formas y tamaños, etc., mediante el fitomejoramiento

tradicional. Véase Guner y Wehner 2004, Hort Science 39(6): 1175-1182 en particular las páginas 1180-1181, en las que se describen los genes de las características de los frutos. Por lo general, los objetivos de selección más importantes son la precocidad, el alto rendimiento de la fruta, la alta calidad interna de la fruta (buen color uniforme, alto contenido de azúcar, proporción adecuada de azúcar y acidez, buen sabor, alto contenido de vitaminas y licopeno, textura firme de la pulpa, textura no fibrosa de la pulpa, ausencia de defectos como corazón hueco, necrosis de la corteza, podredumbre del extremo de la flor o punto de cruz y buenas características de la corteza y resistencia al agrietamiento).

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

Propagaciones vegetativas y cultivos celulares o de tejidos

Las plantas diploides, tetraploides o triploides anteriores también pueden reproducirse vegetativamente (clonalmente) y tales plantas propagadas vegetativamente, o "propagaciones vegetativas" son una realización de la invención. Pueden distinguirse fácilmente de otras plantas de sandía por uno o más (o todos) de los marcadores ligados a *cyv_3.1* (o una variante del mismo) y/o fenotípicamente.

Las propagaciones vegetativas pueden realizarse por diferentes procedimientos. Por ejemplo, uno o más esquejes de una planta de la invención pueden injertarse en un patrón diferente, por ejemplo, un patrón tolerante al estrés biótico o abiótico.

Otros procedimientos incluyen procedimientos de cultivo de células o tejidos *in vitro* y la regeneración de propagaciones vegetativas a partir de dichos cultivos. Dichos cultivos de células o tejidos comprenden o consisten en diversas células o tejidos. En un aspecto, dicho cultivo de células o tejidos comprende o consiste en células o tejidos vegetativos.

En otro aspecto, un cultivo de células o tejidos comprende o consiste en células o tejidos reproductivos, tales como anteras u óvulos. Dichos cultivos pueden tratarse con agentes duplicadores de cromosomas para obtener, por ejemplo, plantas haploides dobles, o pueden utilizarse alternativamente para obtener plantas haploides (por ejemplo, para obtener diploides a partir de un tetraploide o para obtener haploides a partir de un diploide).

Un cultivo celular o tisular *in vitro* puede, por tanto, comprender o consistir en células o protoplastos o tejido vegetal de una parte de la planta seleccionada del grupo que consiste en: fruto, embrión, meristemo, cotiledón, polen, óvulo, hoja, antera, raíz, punta de raíz, pistilo, flor, semilla, tallo. También se incluyen partes de cualquiera de ellos, tal como por ejemplo sólo la cubierta de la semilla (tejido materno).

Así, en un aspecto de la invención se proporciona un cultivo celular o un cultivo tisular de células de una planta que comprende una, dos, tres o cuatro copias de *cyv_3.1* (o una variante), todo ello como se ha descrito anteriormente. Como se ha mencionado, un cultivo celular o un cultivo de tejido comprende células o protoplastos o tejido vegetal de una parte de una planta que comprende *cyv_3.1* puede comprender o consistir en células o tejidos seleccionados del grupo que consiste en: embrión, meristemo, cotiledón, polen, hoja, antera, raíz, punta de raíz, pistilo, flor, semilla, tallo; o partes de cualquiera de ellos.

También se proporciona una planta de sandía regenerada a partir de dicho cultivo celular o cultivo de tejidos, en donde la planta regenerada (o su progenie, por ejemplo, obtenida tras la autofecundación de la planta regenerada) comprende el locus *cyv_3.1* (o una variante del mismo). Por lo tanto, en un aspecto, la planta de sandía que comprende *cyv_3.1* (o una variante del mismo) en una o más copias es una planta de sandía de propagación vegetativa.

En un aspecto diferente descrito en el presente documento, pero no de acuerdo con la invención, las células y tejidos de la invención (y opcionalmente también el cultivo de células o tejidos), que comprenden *cyv_3.1* (o una variante del mismo) en una o más copias, son células o tejidos no propagadores.

Procedimientos y usos de QTL *cyv_3.1* (o una variante) y/o de marcadores ligados a *cyv_3.1* (o a una variante del mismo)

El locus recesivo *cyv_3.1* de la invención (o una variante del mismo), es decir, el fragmento de introgresión que comprende el locus, puede transferirse a, o introducirse en, cualquier otra planta de sandía cultivada, por ejemplo, realizando cruces con plantas de la invención, por ejemplo, plantas cultivadas a partir de las semillas depositadas, o con plantas de la invención propagadas vegetativamente, o identificando plantas silvestres de sandía que comprendan el *cyv_3.1* (o una variante del mismo) e introgresando *cyv_3.1* (o una variante del mismo) de dicha accesión silvestre en sandía cultivada como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, las accesiones silvestres de sandía pueden cribarse con uno o más marcadores ligados al locus *cyv_3.1* (por ejemplo, SNP_02 y/o SNP_03 y/o uno o más marcadores ligados a *cyv_3.1*) para identificar accesiones silvestres putativas que comprenden *cyv_3.1* o una variante del mismo. Dichas accesiones pueden, opcional o alternativamente,

someterse también a cribado fenotípico en un ensayo de resistencia al CVYV y/o pueden cruzarse con plantas de sandía cultivadas y los descendientes del cruce pueden someterse a cribado para el genotipo marcador de resistencia al CVYV y/o el fenotipo de resistencia al CVYV. El experto puede, por lo tanto, identificar el QTL *cyv_3.1* o una variante del mismo en otras accesiones de sandía silvestre, transferirlo a la sandía cultivada en el cromosoma 3, por ejemplo, mediante retrocruzamiento 4, 5, 6, 7 o más veces con líneas de sandía cultivada para generar plantas diploides de sandía de la invención. A continuación, pueden utilizarse para generar tetraploides y triploides como se describe en el presente documento.

Por lo tanto, la resistencia al CVYV conferida por *cyv_3.1*, o una variante de la misma, puede cruzarse en diferentes orígenes genéticos de sandía cultivada, por ejemplo, utilizando semillas depositadas en el presente documento como fuente de *cyv_3.1*, como se describe en otra parte del presente documento, o identificando el *cyv_3.1* (o una variante del mismo) en accesiones de sandía silvestre y (retro)cruzándolo en sandía cultivada.

El *cyv_3.1* (o una variante) puede introducirse en otras plantas de sandía que carezcan de *cyv_3.1* (o una variante) utilizando procedimientos de mejora conocidos. Pueden utilizarse procedimientos de selección conocidos, solos o combinados, tal como (pero sin limitarse a ellos) la selección recurrente, la selección por pedigrí, la selección por retrocruzamiento, el desarrollo de variedades consanguíneas, las pruebas de híbridos, la selección asistida por marcadores, etc. A continuación, se selecciona la progenie que conserva *cyv_3.1* (o una variante) utilizando uno o más de los marcadores proporcionados en el presente documento y/o la resistencia al CVYV (cuando no está presente un alelo *WT* dominante). Así pues, la selección de plantas progenitoras que tengan *cyv_3.1* (o una variante) puede realizarse mediante la selección fenotípica de la resistencia al CVYV en plantas autofecundadas una o más veces y descartando las plantas susceptibles al CVYV. Por ejemplo, si la progenie que segrega para la resistencia al CVYV se inocula o se planta en una zona infestada de CVYV, las plantas resistentes al CVYV pueden identificarse fácilmente.

Así, en un aspecto se describe en el presente documento un procedimiento de generación de una sandía cultivada diploide de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*, pero que no es conforme a la invención, en donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3, en donde dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia al CVYV, que comprende los pasos de: Cruzar una planta de sandía silvestre que comprende un locus que confiere resistencia al CVYV en el cromosoma 3 con una planta de sandía cultivada diploide y seleccionar la progenie de dicho cruce que comprende un genoma de sandía cultivada y un fragmento de introgresión en el cromosoma 3 de la planta de sandía silvestre, por lo que dicho fragmento de introgresión comprende el locus que confiere resistencia al CVYV.

La presencia del locus que confiere resistencia al CVYV en la planta de sandía silvestre y/o en la progenie puede determinarse fenotípicamente utilizando un ensayo de resistencia al CVYV y/o a nivel molecular, detectando la presencia de uno o más de los marcadores descritos en el presente documento vinculados a *cyv_3.1* (o una variante), por ejemplo, uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en:

- a) una Guanina (G) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
- b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

El fragmento de introgresión también puede transferirse a otras plantas diploides cultivadas de sandía, por ejemplo, para combinar la resistencia al CVYV con otros rasgos. Así, en otro aspecto se describe en el presente documento (pero no es un aspecto de acuerdo con la invención) un procedimiento para generar una sandía cultivada diploide de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*, en donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3, en donde dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia al CVYV, que comprende los pasos de:

Cruce de una planta diploide de sandía cultivada que comprende un locus que confiere resistencia al CVYV en el cromosoma 3 (como se ha descrito anteriormente) con otra planta diploide de sandía cultivada, especialmente una planta que carece de un locus que confiere resistencia al CVYV en el cromosoma 3, y selección de la progenie de dicho cruce (por ejemplo, F1, F2, F3 u otra progenie de autofecundación o retrocruzamiento) que comprenda un genoma de sandía cultivada y un fragmento de introgresión en el cromosoma 3 de la planta de sandía silvestre, en donde dicho fragmento de introgresión comprenda el locus que confiere resistencia al CVYV. La progenie también puede ser el resultado de uno o más retrocruzamientos combinados opcionalmente con uno o más autocruzamientos, por ejemplo, BC1, BC1S1, BC1S2, BC2, BC2S1, BC3, etc. De nuevo, la presencia del fragmento de introgresión en la progenie podrá determinarse utilizando uno o más de los marcadores descritos y/o ensayos de resistencia al CVYV.

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

Cribado de semillas de sandía, plantas o partes de plantas (por ejemplo, células) o ADN de dichas semillas, plantas o

partes de plantas para detectar la presencia de uno o más marcadores descritos en el presente documento vinculados a *cyv_3.1* (o una variante), por ejemplo, uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en:

- a) una Guanina (G) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
- b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

Las semillas, plantas o partes de plantas de sandía pueden ser haploides, doble-haploides, diploides, triploides o tetraploides. Obviamente, el cribado de la presencia de uno o más marcadores puede implicar el cribado (detección) de varias copias del marcador, por ejemplo, cuatro copias de Guanina (G) del SNP_02 en un tetraploide. Del mismo modo, alternativa o adicionalmente, el cribado de la ausencia del genotipo SNP WT (susceptible) se engloba en el presente documento. Así, cuando se hace referencia a una planta diploide, parte de la planta o ADN que comprende una Guanina (G) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o en una secuencia que comprende al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, el ensayo marcador alternativamente o además puede detectar la presencia o ausencia de Adenina (A) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

Opcionalmente, el procedimiento comprende además la selección de una o más semillas, plantas o partes de plantas que comprenden el fragmento de introgresión en una copia (por ejemplo, para haploides o diploides), en dos copias (por ejemplo, para diploides o doble-haploides), en tres copias (por ejemplo, para triploides) o en cuatro copias (por ejemplo, para tetraploides).

Los marcadores moleculares descritos en el presente documento pueden detectarse de acuerdo con un procedimiento estándar. Por ejemplo, los marcadores de SNP se pueden detectar fácilmente utilizando un ensayo KASP (véase. www.kpbioscience.co.uk) u otros ensayos de genotipado de SNP. Para desarrollar un ensayo KASP, se pueden seleccionar, por ejemplo, 70 pares de bases aguas arriba y 70 pares de bases aguas abajo del SNP y se pueden diseñar dos cebadores directos específicos de alelo y un cebador inverso específico de alelo. Véase, por ejemplo, Allen et al. 2011, Plant Biotechnology J. 9, 1086-1099 especialmente p097-1098 para el procedimiento de ensayo KASP.

Por lo tanto, en un aspecto, los marcadores de SNP y la presencia/ausencia del marcador asociado con *cyv_3.1* se determinan usando un ensayo KASP, pero igualmente se pueden usar otros ensayos de genotipado de SNP. Por ejemplo, puede utilizarse un ensayo de genotipado de SNP TaqMan, un ensayo de fusión de alta resolución (HRM), matrices de genotipado de SNP (por ejemplo, Fluidigm, Illumina, etc.) o secuenciación de ADN.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un procedimiento para generar una sandía cultivada tetraploide de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*, en donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3, en donde dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia al CVYV, que comprende los pasos de:

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

Opcionalmente, la planta tetraploide se autofecunda una o más veces para producir una línea tetraploide endogámica, que comprende cuatro copias de *cyv_3.1* o una variante de la misma.

Véase, por ejemplo, <http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/wmelon/seedless.html> para la duplicación del cromosoma mediante tratamiento con colchicina y la identificación de tetraploides.

De nuevo, la presencia del *cyv_3.1* o variante del mismo puede determinarse detectando uno o más o todos los marcadores enlazados.

Se describe un procedimiento para generar una planta endocriada tetraploide con resistencia al CVYV, que comprende los pasos de:

- a) proporcionar una línea endocriada diploide que comprenda un fragmento de introgresión de una planta de sandía silvestre en el cromosoma 3, dicho fragmento de introgresión comprenda un locus que confiera resistencia al CVYV, en forma homocigótica, y
- b) duplicar los cromosomas de dicha línea endocriada o parte de planta de la línea para generar una línea tetraploide o parte de planta tetraploide y regenerar una planta tetraploide de la línea, y
- c) autofecundación de la línea tetraploide durante varias generaciones.

En el paso a) la planta diploide puede ser cualquier planta diploide de la invención como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, puede ser una planta derivada de semilla depositada bajo NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666, o progenie de cualquiera de ellas, o puede ser una planta diploide a la que se ha transferido por cruzamiento *cyv_3.1* del depósito de semilla NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666. El diploide también puede ser una nueva planta diploide generada por introgresión *cyv_3.1* o una variante de la misma a partir de una sandía silvestre resistente al CVYV en una sandía cultivada. La introgresión puede proceder, por ejemplo, de PI189318 o de otras accesiones silvestres de sandía.

En otro aspecto más, se describe en el presente documento un procedimiento para generar plantas híbridas triploides de sandía de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*, que comprende: Cruce de una línea parental femenina tetraploide que comprende cuatro copias de *cyv_3.1* (o una variante de la misma) con una línea parental masculina diploide que comprende dos copias de *cyv_3.1* (o una variante de la misma) y recogida de las semillas producidas en la línea parental femenina. Opcionalmente, las semillas recolectadas pueden secarse.

La polinización de la línea femenina tetraploide puede ser manual o por insectos (por ejemplo, abejas) en bloques de aislamiento. Para garantizar la polinización de las flores femeninas tetraploides con el polen del diploide masculino, se pueden utilizar diferentes procedimientos, tal como la recolección manual de las flores masculinas y la polinización manual de las flores femeninas, seguida de la cobertura de la flor polinizada. Otra posibilidad es eliminar todas las flores masculinas (estaminadas) que se desarrollen en las plantas tetraploides para garantizar la polinización de las flores pistiladas de las plantas tetraploides con polen diploide. 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 envasarse para su venta. Así, los envases o recipientes que comprenden o consisten en semillas obtenidas por el procedimiento anterior constituyen una realización del presente documento.

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

- a) Interplantar plantas híbridas triploides de sandía que contengan tres copias de *cyv_3.1* o una variante de la misma y plantas polinizadoras diploides,
- b) permitir que se produzca la polinización de las flores femeninas de las plantas híbridas triploides y, opcionalmente,
- c) recolección de los frutos de las plantas híbridas triploides.

Así, para la producción de frutos sin semillas, el híbrido triploide resistente al CVYV de acuerdo con la invención puede interplantarse con un polinizador diploide adecuado, tal como por ejemplo Jenny o Polimax, o Superpolinizadores (SP-1, SP-2, SP-3, SP-4, SP-5), Sidekick, Escort-4, Companion u otros. Opcionalmente, el polinizador puede ser un polinizador de doble 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 de polinización abierta (OP). A continuación, se cosechan los frutos de las plantas triploides de la invención.

Las plantas triploides pueden injertarse en diferentes portainjertos. El procedimiento se lleva a cabo preferentemente en campo abierto. La interplantación en un campo puede realizarse mediante siembra o trasplantes del polinizador y los triploides. Se pueden utilizar diversos procedimientos de interplantación, como se conoce en la técnica, y se pueden utilizar diversas proporciones de polinizador: híbrido triploide. Una hilera de plantas polinizadoras puede, por ejemplo, estar presente 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 la suelen realizar las abejas, y se pueden proporcionar 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 mecanizada.

Los frutos triploides, que contienen tres copias de *cyv_3.1* (o una variante del mismo), no tienen semillas. Los frutos pueden cosecharse para consumo en fresco o para procesamiento. Los recipientes que comprenden o consisten en una pluralidad de tales frutas o partes de fruta son otra realización de la invención. De este modo, los frutos recolectados pueden clasificarse, envasarse en recipientes, etc. Los contenedores que comprenden o consisten en frutos triploides comprenden o consisten preferentemente en frutos comercializables, que comprenden tres copias de *cyv_3.1* (o una variante) en su genoma. También se incluyen los envases que contienen partes de fruta y los productos alimenticios o piensos que contienen partes de fruta.

Usos de acuerdo con la invención

El uso de *cyv_3.1* (o una variante del mismo) para generar plantas cultivadas de sandía resistentes al CVYV, que producen frutos comercializables, se describe en el presente documento, pero no es conforme a la invención. Se

incluye el uso de cualquiera de los marcadores vinculados a *cyv_3.1* (o una variante del mismo) en la identificación y/o selección de plantas o partes de plantas o progenie que comprenda o conserve *cyv_3.1* (o una variante del mismo).

5 En un aspecto también se describe el uso de una planta diploide o doble-haploide de acuerdo con la invención como progenitor masculino o femenino, por lo que la planta se cruza con otra planta de sandía o se deja autofecundar para producir progenie.

10 En un aspecto se describe el uso de una planta tetraploide de acuerdo con la invención como progenitor masculino o femenino, mediante el cual la planta se cruza con otra planta de sandía (por ejemplo, con un progenitor masculino diploide) o se deja autofecundar para producir progenie. En el presente documento se describe especialmente el uso de un tetraploide como parental femenino en la producción de semillas híbridas triploides de sandía (es decir, producción de semillas F1).

15 En otro aspecto, se proporciona el uso de la planta triploide de acuerdo con la invención en la producción de fruta triploide sin semillas

Semillas y partes de plantas y progenie

20 Se entiende que también es un objeto de la invención proporcionar semillas a partir de las cuales puedan cultivarse las plantas diploides, triploides o tetraploides descritas en el presente documento. También se incluyen en el presente documento las plántulas, los esquejes y los portainjertos, así como las células y los tejidos de las plantas diploides, doble-haploides, triploides o tetraploides de la invención. Tales partes de la planta comprenden *cyv_3.1* (o una variante) de acuerdo con la invención. Una parte de la planta puede, por ejemplo, seleccionarse de entre un injerto, un fruto, un polen, un óvulo, un tallo, un cotiledón, una hoja, una célula, un embrión, un meristemo, una antera, una raíz, una punta de raíz, un pistilo, una flor y/o una semilla.

30 También se proporciona en el presente documento progenie de cualquiera de las plantas de acuerdo con la invención, tal como semillas obtenibles cruzando una planta que comprende *cyv_3.1* (o una variante) descrita en el presente documento con otra planta de sandía y/o autofecundando una planta de acuerdo con la invención para producir semillas F1, y progenie de generaciones posteriores (F2, F3, etc.). La presencia de *cyv_3.1* (o de una variante) en la progenie puede determinarse mediante ensayos de resistencia al CVYV y/o análisis de marcadores.

35 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 *cyv_3.1* o una variante del mismo) incluyen plantas obtenidas por procedimientos de reproducción, tales como autofecundación, cruzamiento, retrocruzamiento, selección recurrente, producción de haploides dobles, selección asistida por marcadores, propagaciones clonales, transformantes, etc., en los que las plantas derivadas comprenden al menos un cromosoma 3 recombinante que comprende *cyv_3.1* (o una variante) de acuerdo con la invención.

40 En un aspecto se proporciona una planta de sandía, de la cual se ha depositado un número representativo de semillas bajo el número de acceso NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666, o la progenie de cualquiera de dichas plantas, por ejemplo, obtenida por cruzamiento y/o autofecundación. En un aspecto se proporciona una semilla de sandía, de la cual un número representativo de semillas se ha depositado bajo el número de acceso NCIMB 42449 o NCIMB 42450 o NCIMB 42666. También se proporciona polen, un óvulo, células, tejidos, propagaciones vegetativas obtenidas de estas plantas, o de la progenie de las mismas. En un aspecto, la progenie conserva el *cyv_3.1* de las plantas cuyas semillas se depositaron bajo NCIMB 42449 o NCIMB 42450 NCIMB 42666. En un aspecto, la progenie conserva el fragmento de introgresión en el cromosoma 3 (que comprende *cyv_3.1*) de las plantas cuyas semillas se depositaron bajo NCIMB 42449 o NCIMB 42450 NCIMB 42666, o un fragmento más pequeño del fragmento de introgresión, en donde el fragmento más pequeño conserva el locus que confiere la resistencia al CVYV (*cyv_3.1*).

Mapeo fino, secuenciación y pruebas de alelismo

55 El locus *cyv_3.1* se encontró en la región comprendida entre aproximadamente 2,50 Mb y aproximadamente 12,8 Mb del cromosoma 3, véase la Figura 1. El mapeo fino puede llevarse a cabo utilizando procedimientos conocidos en la técnica para determinar la posición exacta del locus. Por ejemplo, pueden generarse líneas recombinantes que comprendan partes más pequeñas de la región introgresada y, a continuación, pueden utilizarse ensayos de CVYV para determinar qué fragmento sigue confiriendo resistencia contra el CVYV (y, por tanto, conserva el locus). Alternativamente, la región también puede secuenciarse para identificar genes candidatos de resistencia. Utilizando tales procedimientos o procedimientos similares pueden identificarse marcadores más estrechamente ligados al locus *cyv_3.1* (o variante), por ejemplo, puede identificarse un marcador molecular específico del genoma de la sandía silvestre ligado a *cyv_3.1* (o una variante), dentro de una distancia física de 5 Mb, 3 Mb, 2 Mb, 1 Mb, 0,5 Mb, 0,1 Mb, 74 kb, 50 kb, 20kb, 10kb, 5kb, 2kb, 1kb o menos de SNP_02 o SNP_03.

65 Del mismo modo, cualquier accesión silvestre de sandía resistente al CVYV, por ejemplo, PI189318 u otras, puede cruzarse con sandía cultivada susceptible al CVYV para generar una nueva población de mapeo y determinar si la resistencia al CVYV es conferida por *cyv_3.1* o una variante del mismo, es decir, si un QTL de resistencia al CVYV

está mapeado en la misma región del cromosoma 3, la accesión silvestre contiene claramente el locus *cyv_3.1* o una variante del mismo.

Si dos plantas de sandía tienen ambas resistencia al CVYV y no está claro si la resistencia está causada por el mismo QTL, pueden utilizarse diferentes procedimientos para verificar si está implicado el mismo locus (es decir, *cyv_3.1* o una variante). Como se ha mencionado, se pueden utilizar pruebas de marcadores y/o secuenciación y/o mapeo de QTL o mapeo fino para determinar si un fragmento de introgresión que confiere resistencia procedente de una sandía silvestre está presente en la región del cromosoma 3. Como alternativa o complemento, se puede realizar una prueba de alelismo, es decir, cruzar las dos plantas y analizar la segregación del fenotipo (resistencia al CVYV) en las plantas de la progenie.

Los siguientes ejemplos no limitantes describen plantas que comprenden *cyv_3.1* de acuerdo con la invención. A menos que se indique lo contrario en los Ejemplos, se utilizan procedimientos convencionales de cultivo de sandías, tal como por ejemplo los descritos 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

Nunhems B.V. ha depositado semillas de una línea de sandía cultivada diploide, que comprende *cyv_3.1* en forma homocigota y produce frutos con una corteza de tipo Crimson Sweet bajo el número de acceso NCIMB 42449 y semillas de una línea de sandía cultivada diploide, que comprende *cyv_3.1* en forma homocigota y produce frutos con una corteza de tipo Jubilee bajo el número de acceso NCIMB 42450. Las semillas fueron depositadas por Nunhems B.V. el 18 de agosto de 2015 en NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido. El acceso a los depósitos estará disponible durante la tramitación de esta solicitud para las personas que el Comisionado de Patentes y Marcas determine que tienen derecho a ellos previa solicitud.

Nunhems B.V. ha depositado semillas de una línea élite de sandía cultivada diploide, que comprende *cyv_3.1* en forma homocigota y produce frutos de pulpa roja bajo el número de acceso NCIMB42666. Las semillas fueron depositadas por Nunhems B.V. el 26 de septiembre de 2016 en NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Reino Unido.

Todos los depósitos de semillas se realizaron en el marco del Tratado de Budapest y recurriendo a la solución Expert.

Ejemplos

Ejemplo 1: Resistencia al CVYV - mapeo QTL

Se generaron dos poblaciones cartográficas F2 a partir de cruces entre una accesión de sandía silvestre y una línea endocriada propia susceptible al CVYV. Las poblaciones fueron genotipadas con >3000 SNPs.

El fenotipado de las líneas F3 se realizó utilizando un ensayo CVYV en células climáticas en Italia. La primera hoja verdadera expandida (15 a 20 días después de la siembra) se inoculó a mano, con una segunda inoculación 4-5 días después de la primera. Las plantas de control se inocularon sólo con tampón.

Un total de 14 plantas por genotipo se inocularon con inóculo que contenía CVYV (cepa tipo Almería), en dos repeticiones e incluyendo Sugar Baby como control susceptible. Se utilizó un diseño de bloques aleatorizados. El CVYV se mantuvo en tejido foliar infectado congelado. Para preparar el inóculo se realizó una premultiplicación del virus en la variedad de pepino susceptible Sheila. A continuación, se utilizaron hojas frescas, jóvenes y sintomáticas de la variedad Sheila para preparar el inóculo (1 gramo de hoja fresca por 5 ml de tampón fosfato 0,03M, con carbón activo y tierra de diatomeas se machacaron con un mortero sobre un lecho de hielo).

Las plantas inoculadas se incubaron con 12-14 horas de luz, temperatura diurna de 25 grados Celsius y nocturna de 18 grados Celsius. A intervalos regulares (por ejemplo, 20 días después de la inoculación, 35 días, 50 días y 65 días) se evaluaron los síntomas del CVYV en las hojas. El control susceptible, Sugar Baby, debe ser severamente sintomático después de 30 dpi. Las plantas individuales se clasificaron en tres clases: a) susceptibles - presencia de síntomas en las hojas, b) resistentes - ausencia de síntomas en las hojas, c) dudosas. Al menos el 90% de las plantas de una línea debían puntuar como "resistentes" para que la línea se considerase resistente.

El mapeo QTL reveló un QTL principal para la resistencia a CVYV en el cromosoma 3 en ambas poblaciones de mapeo, que se denominó *cyv_3.1*.

Para localizar mejor el QTL se identificaron más marcadores SNP en el intervalo de confianza. Se identificaron tres marcadores estrechamente ligados al QTL, véase la Tabla 1 (*supra*), denominados SNP_01, SNP_02 y SNP_03.

SNP	Cromosoma	Posición de la base en el cromosoma 3
SNP_01	Chr_03	7586752
SNP_02	Chr_03	7664093
SNP_03	Chr_03	7693225

Ejemplo 2: Retrocruzamiento de cyv3.1 en líneas de élite

Mediante retrocruzamiento asistido por marcadores, *cyv_3.1* se retrocruzó (de 4 a 6 retrocruzamientos) con varias líneas de élite y las semillas de dos líneas de élite se depositaron con los números de acceso NCIMB 42449 y NCIMB 42450.

Las plantas de NCIMB 42449 y NCIMB 42450, y su progenie autofecundada, se evaluaron (fenotipadas) para resistencia contra CVYV en dos años consecutivos en celdas climáticas en Murcia, de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1.

Los resultados se muestran en la Tabla 4:

2014 fenotipado:						
Línea de planta	Repetición	Número de plantas	Primera evaluación (% de plantas resistentes)	Segunda evaluación (% de plantas resistentes)		
NCIMB42449	1	10	100	100		
NCIMB42449	2	10	100	100		
NCIMB42449	3	10	100	100		
NCIMB42450	1	10	80	80		
NCIMB42450	2	10	100	100		
Línea susceptible	1	10	0	0		
Línea susceptible	2	10	30	20		
Línea susceptible	1	10	40	0		
Línea susceptible	2	10	50	20		
Línea susceptible	3	10	40	10		
Sugar Baby (control)	Múltiples	50	22	0		
2015 fenotipado:						
Progenie de NCIMB42449			1	14	100	100
Progenie de NCIMB42449			2	13	100	100
Progenie de NCIMB42449			3	14	100	100
Progenie de NCIMB42449			4	15	100	100
Progenie de NCIMB42450			1	15	100	100
Progenie de NCIMB42450			2	15	100	100
Progenie de NCIMB42450			3	14	100	100
Progenie de NCIMB42450			4	14	100	100
Progenie de NCIMB42450			5	14	100	100
Sugar Baby (control)			Múltiples	35	27	0

Ejemplo 3: Validación de marcadores

La validación de estos marcadores en una colección de material de sandía diferente permitió descubrir dos haplotipos de resistencia al CVYV, en los que el SNP_01 podía distinguir los haplotipos. Todos los híbridos comerciales probados tenían el mismo genotipo que Sugar Baby y todos eran susceptibles al CVYV.

Tabla 5:

	SNP_01	SNP_02	SNP_03	Resistencia CVYV
Línea endógama - NCIMB 42666	GG	GG	CC	Resistente
Línea endógama - NCIMB 42449	AA	GG	CC	Resistente
Línea endógama - NCIMB42450	AA	GG	CC	Resistente
SUGAR BABY	GG	AA	TT	Susceptible

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

Como a partir de la bibliografía se sabía que la resistencia al ZYMV también se localiza en el cromosoma 3, los inventores querían saber si las plantas resistentes al CVYV también eran resistentes al ZYMV. Inocularon NCIMB 42449 y NCIMB 42450 con la cepa europea o estadounidense del ZYMV. También volvieron a analizar los datos del marcador SNP para el SNP que se había publicado que estaba vinculado al gen *zym*, denominado SNP_04 en el presente documento.

Tabla 6:

	SNP_01	SNP_02	SNP_03	SNP_04	Resistencia CVYV	Resistencia ZYMV
Línea consanguínea - no depositada	GG	GG	CC	GG	Resistente	Resistente
Línea endógama - NCIMB 42449	AA	GG	CC	TT	Resistente	Susceptible
Línea endógama - NCIMB42450	AA	GG	CC	TT	Resistente	Susceptible
SUGAR BABY	GG	AA	TT	TT	Susceptible	Susceptible

Los resultados mostraron que *cyv_3.1* y *zym* son loci independientes en el cromosoma 3 y que SNP_04 puede utilizarse para diferenciar entre plantas resistentes y susceptibles a ZYMV.

Ejemplo 5: Líneas tetraploides

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

Ejemplo 6: cribado de accesiones silvestres de sandía

La progenie de accesiones silvestres, diploides, de sandía procedentes, por ejemplo, de la colección GRIN de EE. UU. se sometió a cribado para determinar la resistencia al CVYV y su genotipo SNP para SNP_01, SNP_02 y SNP_03.

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

Tabla 7:

	SNP_01	SNP_02	SNP_03	Resistencia CVYV
PI189318	GG	GG	CC	Resistente

Esta sandía silvestre puede, por lo tanto, utilizarse para introgresar *cyv_3.1* en la sandía cultivada, por ejemplo, mediante retrocruzamiento.

Opcionalmente se puede llevar a cabo una prueba de alelismo, cruzando PI189318 con plantas cultivadas a partir de semillas depositadas aquí para confirmar que PI189318 contiene el gen *cyv_3.1*.

REIVINDICACIONES

1. Una planta diploide cultivada de sandía de la especie *Citrullus lanatus* ssp. *vulgaris*, en donde dicha planta comprende un fragmento de introgresión de una planta silvestre de sandía en el cromosoma 3, en donde dicho fragmento de introgresión comprende un locus que confiere resistencia al virus del amarilleamiento de las venas del pepino (CVYV) y en donde el fragmento de introgresión comprende:
 - a) una Guanina (G) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO:2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y
 - b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3y en donde el locus que confiere resistencia al CVYV se obtiene cruzando una planta de sandía cuyas semillas se depositaron con el número de acceso NCIMB42449, NCIMB42450 o NCIMB42666 con otra planta de sandía.
2. La planta de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento de introgresión es un fragmento que comprende la región que comienza en 2,50 Mb y termina en 12,80 Mb del cromosoma 3, o una parte del mismo, en donde la parte tiene un tamaño de al menos 5 kb.
3. La planta de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la planta produce frutos con un grado brix de al menos 7,0.
4. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha planta es homocigótica para el fragmento de introgresión y la planta es resistente al CVYV.
5. Una planta de sandía tetraploide obtenida mediante la duplicación de los cromosomas de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
6. La planta de sandía tetraploide de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la planta es una línea endogámica.
7. Una semilla de sandía triploide hecha polinizando la planta tetraploide de la reivindicación 5 o 6 con polen de la planta de sandía diploide de la reivindicación 4.
8. Una planta triploide cultivada a partir de la semilla de la reivindicación 7.
9. Semilla a partir de la cual se puede cultivar una planta de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
10. Una planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8, en donde la planta es una planta de propagación vegetativa.
11. Un cultivo de células o tejidos de una planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8, en donde las células o tejidos comprenden el fragmento de introgresión.
12. El cultivo celular o tisular de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende células o protoplastos o tejido vegetal de una parte de la planta seleccionada del grupo que consiste en: púa, fruto, embrión, meristemo, cotiledón, polen, óvulo, hoja, antera, raíz, punta de raíz, pistilo, flor, semilla, tallo.
13. Una parte de la planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha parte se selecciona de un injerto, fruto, polen, óvulo, tallo, cotiledón, hoja, célula, embrión, meristemo, antera, raíz, punta de raíz, pistilo, flor, semilla y en donde las células de dicha parte de la planta comprenden el fragmento de introgresión.
14. Una planta de sandía regenerada a partir del cultivo de células o tejidos de la reivindicación 11.
15. Un procedimiento de cribado de semillas, plantas o partes de plantas de sandía, o de ADN procedente de dichas semillas, plantas o partes de plantas, para detectar la presencia de uno o más marcadores ligados a la resistencia al CVYV en el cromosoma 3, comprendiendo dicho procedimiento la determinación de la presencia de:
 - a) una Guanina (G) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 2 (SNP_02) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; y/o
 - b) una citosina (C) en el nucleótido 76 de SEQ ID NO: 3 (SNP_03) o de una secuencia que comprende al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

16. Un procedimiento para la producción de frutos de sandía triploide sin semillas, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) interplantar semillas híbridas triploides o plantas híbridas triploides de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 con plantas polinizadoras diploides, y opcionalmente
- (b) recolección de los frutos de sandía sin pepitas producidos en las plantas triploides de la letra a).

5

Figura 1

