

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 341 527**

21 Número de solicitud: 200900003

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **18.12.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.2010**

Fecha de la concesión: **27.04.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **10.05.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
10.05.2011

73 Titular/es: **Universidad Politécnica de Valencia
CTT-Edif. 6G - Camino de Vera, s/n
46022 Valencia, ES
Universidad de Almería y
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

72 Inventor/es: **Moreno Ferrero, Vicente;
Pineda Chaza, Benito José;
Giménez Caminero, Estela;
Lozano Ruiz, Rafael;
Capel Salinas, Juan;
Atarés Huerta, Alejandro;
García Sogo, Begoña;
Antón Martínez, María Teresa y
Angosto Trillo, Trinidad**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Nuevo cultivar con frutos y sépalos convertidos en frutos de alto interés para su consumo fresco y procesado industrial.**

57 Resumen:

Nuevo cultivar con frutos y sépalos convertidos en frutos de alto interés para su consumo fresco y procesado industrial.

En la presente invención se describen secuencias de nucleótidos capaces de incrementar la expresión de un gen de desarrollo reproductivo lo que tiene como resultado la generación de cultivares con un fruto de alto interés para su consumo fresco y procesado industrial caracterizado por poseer características mejoradas respecto de los cultivares conocidos de variedades comerciales. Estos nuevos cultivares tienen el cáliz de la flor carnoso y convertido en fruto. El fruto verdadero y el cáliz tienen mayores niveles de azúcares y licopeno y un mayor contenido en grados Brix. Además, exhiben una mayor tasa de cuajado de fruto y tienen inhibida la zona de abscisión del fruto, lo que facilita la recolección mecánica.

ES 2 341 527 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Nuevo cultivar con frutos y sépalos convertidos en frutos de alto interés para su consumo fresco y procesado industrial.

En la presente invención se describen secuencias de nucleótidos capaces de incrementar la expresión de un gen de desarrollo reproductivo lo que tiene como resultado la generación de cultivares con un fruto de alto interés para su consumo fresco y procesado industrial caracterizado por poseer características mejoradas respecto de los cultivares conocidos de variedades comerciales. Estos nuevos cultivares tienen el cáliz de la flor carnoso y convertido en fruto. El fruto verdadero y el cáliz tienen mayores niveles de azúcares y licopeno y un mayor contenido en grados Brix. Además, exhiben una mayor tasa de cuajado de fruto y tienen inhibida la zona de abscisión del fruto, lo que facilita la recolección mecánica.

Estado de la técnica anterior

En el momento presente, la novedad se ha convertido en un factor esencial que determina la elección por parte del consumidor de ciertos productos comestibles como las frutas y hortalizas.

Hace años, el consumidor podía elegir entre una amplia variedad de frutos de una determinada especie como el tomate. Sin embargo, con el tiempo, el desarrollo de cultivares híbridos, más adaptados a un cultivo intensivo, con mayor rendimiento, resistencia a ciertas enfermedades y que producían fruta uniforme y con mejor apariencia externa, fue arrinconando poco a poco a los cultivares tradicionales. Como consecuencia, el consumidor disponía de una fruta con buena calidad externa pero con escasa calidad organoléptica y una gama de tipos muy limitada.

La tendencia ha cambiado en los últimos años, ya que el consumidor se inclina cada vez más por la calidad y la novedad del producto. Esta tendencia se hace patente también en la gastronomía actual en la que prima la novedad en todos sus aspectos, desde la presentación de productos tradicionales con formatos diferentes e imaginativos hasta la introducción de nuevos alimentos que representan un reto para el paladar del gourmet más exigente. En este contexto, la introducción en el mercado de sépalos de una flor de tomate convertidos en frutos representa una novedad que puede ser bien aceptada por el consumidor actual.

La calidad organoléptica y nutritiva son dos atributos esenciales para el consumidor. Tal y como se ha comentado antes, hasta hace poco, el consumidor demandaba frutos de tomate con dos características esenciales: uniformidad y apariencia. La demanda de estos atributos relacionados con la calidad externa explica la preponderancia de los cultivares híbridos a lo largo de los últimos años. El problema es que la mejora de la calidad externa del producto (claramente patente en los cultivares híbridos) no se vio acompañada por una mejora de la calidad organoléptica, sino todo lo contrario. Las quejas del consumidor en torno a la baja calidad organoléptica de los frutos de tomate procedentes de los cultivares híbridos explica el éxito reciente de algunos cultivares autóctonos que, pese a dar menos rendimiento y producir frutos irregulares y de peor apariencia, tienen una mayor calidad organoléptica. Uno de los ejemplos más notables de este cambio de tendencia es la demanda de tomate RAF que, pese a su deficiente calidad externa, tiene una excelente calidad organoléptica. Además de la calidad organoléptica, en el momento presente, el consumidor demanda productos con buena calidad nutritiva y de ahí el éxito que están teniendo los denominados "alimentos funcionales" que se caracterizan por tener algún atributo que los hace beneficiosos para la salud humana.

El contenido de grados Brix, una estima del contenido en sólidos solubles, se utiliza habitualmente como un parámetro de calidad en el tomate para el consumo en fresco. No obstante este parámetro es, si cabe, aún más importante a la hora de estimar la calidad del tomate utilizado para el procesado industrial. La mejora tradicional ha tenido un éxito muy limitado en este sentido debido a la relación negativa entre producción y contenido en sólidos solubles (Stevens (1979). *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 104 (1): 40-42; Stevens (1986). *Plant Breeding Reviews*. 4: 273-311). A partir de híbridos interespecíficos entre el tomate (*S. lycopersicum*) y algunas especies silvestres relacionadas (e.g. *S. chmielewskii* y *S. cheesmaniae*), se han derivado líneas con un mayor contenido en sólidos solubles (Rick (1974). *Hilgardia* 42: 493; Hewitt y Garvey (1987). *Tomato Biotechnology*. D. J. Nevins and R. A. Jones, Eds.4: 45-54, Alan R Liss, New York, NY, USA; Poysa (1993). *Canadian Journal of Plant Science* 73 (1): 273-279) que se están utilizando actualmente en programas de mejora. Sin embargo, la naturaleza compleja del carácter y el ligamiento de algunos de los genes que lo controlan con otros que determinan caracteres agrónomicamente indeseables (e.g. baja producción o reducción del calibre del fruto) dificulta notablemente su manejo en los programas de mejora (Ibarbia y Lambeth (1969). *Journal of the American Society of Horticultural Science* 94: 496-498; Tanksley y Hewitt (1988). *Theoretical and Applied Genetics* 75 (5):811-823; Paterson *et al.* (1988). *Nature* 335 (6192): 721-726; Paterson *et al.* (1991). *Genetics* 127 (1): 181-197; Goldman *et al.* (1995). *Theoretical and Applied Genetics* 90 (7-8): 925-932). Debido a estos problemas, los cultivares de tomate habitualmente empleados para el procesado industrial (e.g. zumos, ketchup, etc.) dan frutos con un contenido en sólidos solubles que no supera los 5,5 - 6,0° Brix.

La producción de un cultivar depende de muchos factores, como la síntesis, distribución y compartimentación de fotoasimilados, el tamaño, forma y peso del fruto, etc. Una aproximación alternativa para aumentar la producción consiste en aumentar el "índice de cosecha" (relación entre la parte que se cosecha y la biomasa total de la planta) a través de una modificación de la arquitectura de la planta, del número de inflorescencias por planta, del número de flores por inflorescencia o del número de flores que cuajan frutos.

ES 2 341 527 B1

Además, conviene resaltar que la supresión de la zona de abscisión del fruto es un carácter relevante en los cultivares de tomate utilizados para la industria, ya que en este tipo de cultivares la recolección se realiza con maquinaria agrícola. De hecho, el mutante *jointless* de tomate (caracterizado también por la supresión de la zona de abscisión del fruto) se ha utilizado para la obtención de cultivares de tomate de industria adaptados a la recolección con maquinaria agrícola.

Hasta la fecha no se han descrito mutantes de inserción que presenten frutos con los sépalos convertidos en frutos, con un contenido de grados Brix elevado (más alto que en los frutos comerciales), con un índice de cosecha (y un cuajado del fruto) superior y con la supresión de la zona de abscisión.

Explicación de la invención

En la presente invención se describen secuencias de nucleótidos capaces de incrementar la expresión de un gen de desarrollo reproductivo lo que tiene como resultado la generación de cultivares con alto interés para su consumo en fresco y procesado industrial caracterizados por poseer frutos con características mejoradas respecto de los cultivares conocidos de variedades comerciales o de aquellos sin aumento en los niveles de expresión del gen. El gen de desarrollo reproductivo es, preferiblemente, *TAGL1*. Se ha convenido en denominar a este nuevo cultivar, mutante ALK o simplemente cultivar ALK. Las ventajas de estos nuevos cultivares ALK de la especie *Solanum lycopersicum* (en adelante, tomate) son las siguientes:

- 1) El cáliz de la flor se convierte en fruto por lo que es susceptible de ser empleado como un nuevo órgano comestible o como una alternativa al fruto verdadero para el procesado industrial;
- 2) El fruto verdadero y el cáliz convertido en fruto de los cultivares ALK tienen mayores niveles de azúcares (glucosa y fructosa) y licopeno, un antioxidante beneficioso para la salud;
- 3) Los frutos verdaderos, así como los cálices convertidos en frutos, tienen un contenido en grados Brix notablemente superior al de los frutos de los cultivares actuales que se utilizan para la industria; y
- 4) Los nuevos cultivares exhiben una mayor tasa de cuajado de fruto (lo que aumenta el número de frutos por racimo) y tienen inhibida la zona de abscisión del fruto, lo que facilita la recolección mecánica, una práctica habitual en el tomate de industria.

Este nuevo cultivar de tomate se basa en el aumento del nivel de expresión del gen *Agamous-like 1* de tomate (*TAGL1*) que se ha logrado en el mutante de inserción ALK de tomate. Las nuevas propiedades que confiere la modificación del citado gen se manifiestan de forma estable no sólo en el mutante original (la inserción del ADNt se ha llevado a cabo en el cultivar SLDG2), sino también en cualquier otro cultivar de tomate, como por ejemplo “p73” o “Moneymaker”.

Cabe destacar en este punto el efecto sorprendente y novedoso que deriva de la inserción de las secuencias de la presente invención en el ADN de la planta, tal como se describirá más adelante. La inserción de estas secuencias tal como se describe en el principal aspecto de la presente invención y sucesivos, produce un efecto no esperado en los frutos que produce la planta transformada, ya que se consiguen características fenotípicas y organolépticas que superan con creces las características que ofrecen los cultivares comerciales conocidos (ver ejemplos). Este efecto es producido por la inserción de una secuencia concreta en una posición determinada de una secuencia nucleotídica reguladora de la expresión del gen que preceden. El efecto esperado de dicha inserción es, *a priori*, la interrupción de la expresión y, sin embargo, se consigue un efecto contrario que genera resultados sorprendentes y no obvios.

Así pues, el principal aspecto de la presente invención es una secuencia de nucleótidos que comprende:

- a. Una secuencia que comprende SEQ ID NO: 1 unida por su extremo 3' a
- b. una secuencia reguladora de la expresión génica,

donde la secuencia de nucleótidos es capaz de incrementar la expresión de un gen.

La secuencia SEQ ID NO: 1 es la secuencia truncada del regulador constitutivo de la expresión génica 35S en una orientación invertida. Es decir, la secuencia se corresponde con una secuencia parcial de la secuencia original del ADN de transferencia (ADNt) insertada en un punto concreto del genoma de la planta.

Esta secuencia difiere de la secuencia original denominada como ADNt en que su procesamiento e inserción en el genoma de las plantas de tomate ha causado la modificación de parte de la secuencia del ADNt transferido al ADN genómico de las plantas por mediación de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta secuencia se inserta en la orientación 3' a 5' (invertida respecto a la orientación con la que se transcribe el gen endógeno) dentro de un locus con orientación 5' a 3', así pues, la secuencia invertida del fragmento truncado, es decir, SEQ ID NO: 1, adquiere, desde un punto de vista funcional, una orientación 5' a 3' con una función definida en la presente invención.

ES 2 341 527 B1

La secuencia SEQ ID NO: 1 se une por su extremo 3' a una secuencia reguladora de la expresión génica. En la presente invención, el término "secuencia reguladora de la expresión génica" hace referencia a una secuencia de ácidos nucleicos que tenga efecto sobre la funcionalidad del gen en lo que se refiere al comienzo de la transcripción de una secuencia de ADN o al inicio de traducción de una secuencia de ARN u otras secuencias no descritas. A modo de ejemplo, entre las secuencias reguladoras de la expresión génica contempladas en la presente invención están los promotores y otras menos comunes como determinados intrones.

La secuencia de nucleótidos de este aspecto de la invención es capaz de incrementar la expresión de un gen. Por incremento de la expresión de un gen se entiende la capacidad de aumentar la transcripción de una secuencia de nucleótidos que define un gen y/o la traducción de su ARN mensajero a proteína. La propia secuencia SEQ ID NO: 1 unida en un lugar concreto de la secuencia reguladora de la expresión de un gen, produce un efecto sorprendente que da lugar al incremento de la expresión del gen al que precede. El gen al que se hace mención es, preferiblemente, un gen de desarrollo reproductivo. Con motivo de la inserción de SEQ ID NO: 1 en el lugar concreto de la región reguladora de la expresión del gen de desarrollo reproductivo, la transcripción del gen no comienza en el lugar habitual, sino dentro del promotor 35S truncado. Por esta razón, el ADN codificante que se obtiene no es idéntico al ADNc de plantas que no contienen la inserción puntual de SEQ ID NO: 1, sino que es una especie de "ADNc híbrido" que incluye secuencias situadas corriente arriba (i.e. en 5') del gen. Más preferiblemente, el gen de desarrollo reproductivo es *Agamous-like*.

En otra realización preferida, la secuencia reguladora de la expresión génica del apartado (b) es SEQ ID NO: 2.

La secuencia SEQ ID NO: 2 es un fragmento promotor original corriente arriba del codón de inicio ATG de la transcripción del gen posterior, hasta el nucleótido en el que se insertó el ADNt, entre el nucleótido 104 y el nucleótido 105 contando desde el nucleótido siguiente al A del ATG del gen. El resultado de la secuenciación dio como resultado una secuencia reguladora de la expresión del gen posterior de 72 nucleótidos, que no ha sido descrita con anterioridad. La secuencia más similar a SEQ ID NO: 2 encontrada en *Genebank database* fue la de clon L3C1 del gen homólogo al de la presente invención PAGL1 de *Petunia inflata* con una cobertura de un 61% de la secuencia del fragmento de promotor y un 84% de identidad.

En la presente invención también se contempla una secuencia de nucleótidos donde la secuencia SEQ ID NO: 1 se une por su extremo 5' al extremo 3' de una secuencia que comprende parte de la secuencia del ADNt resultante de su integración en el genoma de las plantas de tomate. También se incluye una secuencia de nucleótidos donde SEQ ID NO: 1 está unida por su extremo 3' a SEQ ID NO: 3 y, a su vez, unida por su extremo 5' a la parte de la secuencia del ADNt referida anteriormente.

De forma más gráfica, los elementos fundamentales que componen el ADNt original son, según la orientación 5' a 3': Promotor 35S-GUS-NosT-Promotor 35S-NPTII-35ST y al integrarse en el ADN genómico de las plantas de tomate los elementos anteriores quedaron en la orientación siguiente: NPTII-35S-NosT-GUS-35S modificado (Fig 2). Así pues, la secuencia a que se hace referencia en el párrafo anterior está compuesta por la secuencia de ADNt sin incluir la secuencia que corresponde al 35S truncado, es decir, está compuesta por la secuencia de nucleótidos de los elementos principales NPTII-35S-NosT-GUS. Asimismo también se puede obtener el mismo resultado que el obtenido en la presente invención si la secuencia del ADNt que ha sido secuenciada corriente arriba del fragmento del promotor de *TAGL1* o cualquier fragmento de la misma, se inserta de forma invertida, al igual que en la planta de tomate de la presente invención, en la orientación 3' a 5', en un nucleótido dentro de un promotor de un gen homólogo mediante la cual se consiga un incremento en la expresión del gen posterior.

Otra realización preferida es una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las realizaciones anteriores donde la secuencia reguladora de la expresión génica se une por el extremo 3':

- a. al extremo 5' de SEQ ID NO: 3 o
- b. al extremo 5' de cualquiera de las secuencias con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 3.

La secuencia SEQ ID NO: 3 es la secuencia codificante (ADNc; secuencia que contiene sólo los exones) del gen *TAGL1*. La secuencia de nucleótidos de esta realización preferida puede estar unida a otra secuencia cuya transcripción de lugar al mismo ARN mensajero, es decir, que codifican para la misma proteína. Por tanto, la secuencia de nucleótidos de esta realización preferida puede estar unida a la secuencia SEQ ID NO: 4 del gen *TAGL1*. La secuencia SEQ ID NO: 4 es la secuencia del gen *TAGL1* con intrones (no codificantes) y exones (SEQ ID NO: 6), es decir, corresponde con la secuencia genómica de *TAGL1*. Tras el procesado (*splicing*) del ARN mensajero transcrito de SEQ ID NO: 4, se da lugar a una proteína idéntica partiendo de cualquiera de las dos secuencias, la de ADNc (SEQ ID NO: 3) o la de ADN con intrones y exones (SEQ ID NO: 4). Por tanto, en esta realización preferida están incluidas todas aquellas secuencias según cualquiera de las realizaciones anteriores donde la secuencia reguladora de la expresión génica se une por el extremo 3' al extremo 5' de la secuencia SEQ ID NO: 3 (o a la secuencia SEQ ID NO: 4), es decir (en sentido 5' a 3'); SEQ ID NO: 1 - Secuencia reguladora de la expresión génica - SEQ ID NO: 3/ SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 3/ SEQ ID NO: 4, o las secuencias que resultan de sustituir SEQ ID NO: 3 (o SEQ ID NO: 4) de cualquiera de las secuencias anteriores con otra secuencia con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 3. Tal como se ha mencionado en un párrafo anterior, Con motivo de la inserción de SEQ

ES 2 341 527 B1

ID NO: 1 en el lugar concreto de la región reguladora de la expresión de las secuencias SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, la transcripción del gen no comienza en el lugar habitual, sino dentro de la secuencia SEQ ID NO: 1 (promotor 35S truncado e invertido). Por esta razón, el ADNc que se obtiene no es idéntico al ADNc de plantas que no contienen la inserción puntual de SEQ ID NO: 1, sino que es una especie de “ADNc híbrido” que incluye secuencias situadas corriente arriba (i.e. en 5’) del gen.

Las secuencias con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 3 son secuencias homologas del gen *Agamous-like 1* de *Solanum lycopersicum* de otras plantas donde la proteína que codifican tiene una función idéntica a la del citado gen. Las secuencias homologas se refieren a secuencias de especies distintas con expresiones fenotípicas similares que proceden de una secuencia ancestral común. Dentro de la homología de secuencia se distinguen dos tipos de homología: la ortología y la paralogía. Las secuencias ortólogas pertenecen a especies que tienen un antepasado común. Las secuencias parálogas son aquellas que se encuentran en el mismo organismo y una procede de la duplicación de la otra. En esta realización preferida de la presente invención se consideran todas las secuencias homologas, tanto ortólogas como parálogas, que tienen, al menos, un 80% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 3.

Asimismo, en la presente invención puede incluirse una secuencia de nucleótidos reguladora de la expresión génica que sustituye a SEQ ID NO: 1, donde la regulación consiste en un incremento de la expresión del gen que precede, solamente cuando se dan las condiciones óptimas que activan la expresión del citado gen por medio de la unión de componentes moleculares a la secuencia que sustituye a SEQ ID NO: 1. Por tanto, esta secuencia de nucleótidos puede ser la secuencia de un promotor constitutivo o inducible específico de órgano reproductivo (de cualquier especie) que conduzca a un incremento en la expresión del gen en flor y fruto.

Otro aspecto de la presente invención es una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos según cualquiera de las realizaciones descritas hasta aquí. La secuencia de aminoácidos puede estar codificada por cualquier secuencia nucleotídica que de lugar a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la invención por medio de la transcripción de la secuencia nucleotídica a un ARN mensajero y su posterior traducción a la secuencia de aminoácidos. Debido a que el código genético es degenerado, un mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes codones (tripletes), por ello, la misma secuencia de aminoácidos puede ser codificada por distintas secuencias de nucleótidos.

Un aspecto más de la presente invención es un vector que comprende la secuencia de nucleótidos según cualquiera de las secuencias incluidas en el aspecto principal y en cualquiera de las realizaciones preferidas y otros aspectos descritos hasta aquí. El vector de este aspecto es cualquiera que comprenda cualquiera de las secuencias descritas.

El término “vector” se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y, como el término lo indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de ADN que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector puede comprender cualquiera de las secuencias descritas según los aspectos anteriores que, fusionadas al mismo puede replicarse en el huésped adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmicos, bacteriófagos o vectores virales, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector.

En adelante para mencionar las secuencias descritas anteriormente se empleará el término “las secuencias de la invención” o “cualquiera de las secuencias de la invención”.

Otro aspecto de la presente invención es una célula que comprende cualquiera de las secuencias de la invención (en adelante, célula de la invención).

El término “célula” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica y, fundamentalmente, hace referencia a una célula eucariótica vegetal y dentro de este grupo, más preferiblemente, a aquellas células pertenecientes al reino Plantae. Así pues, el término célula comprende, al menos, una célula del parénquima, célula meristemática o de cualquier tipo, diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula de una planta que carece de pared celular).

Otro aspecto más de la presente invención es una célula que comprende el producto de la expresión de la secuencia según cualquiera de los aspectos anteriores (en adelante, célula de la invención).

El término “producto de la expresión de la secuencia” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a cualquier producto resultante de la expresión de la secuencia de nucleótidos según cualquiera de los aspectos anteriores. Así pues, como producto resultante de la expresión de la secuencia se entiende, por ejemplo, el ARN que se obtiene de la transcripción de la secuencia, el ARN procesado, la proteína resultante de la traducción del ARN o posteriores modificaciones de la secuencia nucleotídica en el interior de la célula siempre que la secuencia resultante tenga su origen en la secuencia original transferida o no pierda la característica funcional que la caracteriza en la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención hace referencia a polen que comprende la célula de la invención. Este aspecto tiene elevado interés puesto que la transmisión de los caracteres genéticos y fenotípicos puede llevarse a cabo por la

polinización de cualquier variedad vegetal compatible con el polen al que se hace referencia. De este modo se consigue una planta que comprende las secuencias de la presente invención y, tras los respectivos cruces y selecciones, se puede obtener una planta en la que la secuencia se integra de forma estable y en un número de copias adecuado para obtener los mismos caracteres deseables en las posteriores generaciones.

Otro aspecto más de la presente invención es una planta que contiene la célula de la invención. El término “planta” engloba cada una de las partes de la misma, que pueden ser conservadas o cultivadas de forma aislada o en combinación, así como el germoplasma. El germoplasma queda definido por aquel material biológico que contiene la variabilidad genética intraespecífica o a los materiales genéticos que pueden perpetuar una especie o una población de un organismo. Así pues germoplasma es la semilla, cultivo de tejido de cualquier parte de la planta o plantas establecidas en colecciones *ex situ*, sin excluir cualquier otro material que entre en esta definición.

La especie de planta de la invención puede ser cualquier planta cuyo fruto tenga interés para su consumo fresco, procesado industrial o interés ornamental ya que las características funcionales esenciales de la presente invención están relacionadas con la obtención de un fruto original, único y característico, con características organolépticas mejoradas. Por “fruto original” se entiende el fruto verdadero y el sépalo convertido en fruto. Teniendo en cuenta que el cultivar que se describe en la presente invención tiene su origen en el aumento de expresión, que a su vez genera la expresión ectópica (i.e. en una localización diferente a la que es habitual), de un gen relacionado con el desarrollo reproductivo del que se conocen homólogos en muchas plantas, es de suponer, que la transferencia e inserción, en el lugar adecuado, de las secuencias de la invención a cualquier planta donde el producto obtenido de las secuencias anteriores tenga la misma función, origine como resultado frutos con las características propias de la nueva variedad descrita en la presente invención. En este sentido, preferiblemente, la planta selecciona de la lista que comprende especies de las familias Solanáceas, Cucurbitáceas, sin excluir otras no mencionadas.

La planta puede contener cualquiera de las secuencias de la invención en homocigosis, heterocigosis o hemicigosis (en adelante, la planta de la invención), aunque la planta con la mutación ALK en homocigosis tiene las características más interesantes, tal como se describe en los ejemplos de la presente invención.

La planta de la invención puede conseguirse por transformación genética mediada por biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de las secuencias de la invención en el ADN de la planta, ya sea éste genómico, cloroplástico o mitocondrial. Asimismo, la planta también puede conseguirse por transferencia de cualquiera de las secuencias de la invención por cruzamiento, es decir, empleando polen de la planta de la invención para polinizar cualquier otra planta que no contenga cualquiera de las secuencias de la invención o polinizando los gineceos de plantas que contengan cualquiera de las secuencias de la invención con otro polen de plantas que no contengan estas secuencias. Los métodos para conseguir la planta de la invención no se limitan exclusivamente a los métodos descritos en este párrafo.

En una realización preferida del aspecto anterior la planta pertenece a la especie *Solanum lycopersicum*. Así pues, la planta puede pertenecer a cualquier línea o cultivar de *Solanum lycopersicum* con crecimiento determinado (como por ejemplo, el cultivar SLGD2), semideterminado (como por ejemplo, “p73”) o indeterminado (como por ejemplo, el cultivar “Moneymaker”). Los ejemplos de cultivares anteriores no excluyen el uso de otro tipo de cultivar. La planta de la invención perteneciente a la especie *Solanum lycopersicum* tiene una mayor tasa de cuajado del fruto y también tiene suprimida la zona de abscisión del fruto. Por estas dos razones la planta de la presente invención es idónea para la recolección mecánica, una práctica que es habitual en la recolección del tomate para la industria.

Otro aspecto de la presente invención es un fruto de cualquiera de las plantas anteriores y, más preferiblemente, de la planta de *Solanum lycopersicum* según la realización anterior (en adelante, tomate de la invención). Tal como se describe en la parte inicial de este apartado y en los ejemplos, el tomate de la invención tiene una parte comestible que lo diferencia del resto de tomates comercializados: el cáliz, que se ha convertido en una parte carnosa. Además, el fruto verdadero y el cáliz convertido en fruto de los nuevos cultivares ALK tienen mayores niveles de azúcares (glucosa y fructosa) y licopeno, un antioxidante beneficioso para la salud, y además, un contenido en grados Brix notablemente superior al de los frutos de los cultivares actuales que se utilizan para la industria.

Otro aspecto más es una semilla del tomate de la invención. La semilla del tomate podría ser empleada para reproducir la planta de la invención ya que contiene un embrión con el material genético que comprende las secuencias de la invención y reservas almacenadas para servir como fuente de nutrientes del embrión, de la que puede desarrollarse una nueva planta bajo condiciones apropiadas.

El siguiente aspecto de la presente invención es un método para la construcción del vector, definido en el aspecto correspondiente, que comprende:

- a. Seleccionar cualquiera de las secuencias de la invención,
- b. insertar la secuencia del apartado (a) en un vector y
- c. seleccionar el vector obtenido según el apartado (b).

ES 2 341 527 B1

La inserción de cualquiera de las secuencias de la invención en un vector se puede llevar a cabo por medio de los métodos de clonación que forman parte del conocimiento general común, mediante corte de las secuencias y el vector con enzimas de restricción y su posterior ligación, de forma que la secuencia del vector integre la secuencia de la invención seleccionada.

La selección del vector que comprende la secuencia de la invención escogida, puede llevarse a cabo mediante técnicas como;

- Selección de células que contengan los vectores de la invención mediante la adición de antibióticos al medio de cultivo. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del vector.
- Digestión con enzimas de restricción mediante las cuales se obtenga un fragmento de alguna de las secuencias de la invención insertada en el vector.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la obtención de la célula, definida en el aspecto correspondiente, que comprende:

- a. Obtener una célula de una muestra biológica,
- b. transformar la célula del apartado (a) con un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención y
- c. seleccionar la célula transformada según el apartado (b).

En la presente invención, el término “muestra biológica” hace referencia a una muestra tanto de microorganismos como de tejido vegetal. Preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de tejido vegetal. La obtención de la célula es intrínseca a la obtención del tejido. Los tejidos vegetales están formados por células diferenciadas salvo excepciones como es el caso de tejidos meristemáticos donde las células son indiferenciadas. Las células vegetales son totipotentes, es decir, contienen una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa.

La muestra biológica y, en concreto, la célula, se obtiene de cualquier tipo de cultivo microbiológico (por ejemplo *E. coli* o *Agrobacterium tumefaciens*) o tejido vegetal.

La transformación genética de las células se lleva a cabo por medio de técnicas que forman parte del conocimiento general común, como por ejemplo, transformación genética mediada por biolística, *Agrobacterium tumefaciens* o cualquier otra técnica que permita la integración de cualquiera de las secuencias de la invención en el ADN de la célula. Mediante estas técnicas se consigue introducir, de forma estable, un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención, de forma que, tras sucesivas divisiones de la célula, la secuencia incorporada sigue expresándose.

La célula transformada con un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención puede incorporar la secuencia en alguno de los ADN de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico (en este caso se suele insertar una secuencia de ADNt que contiene, entre otras secuencias, cualquiera de las secuencias de la invención), o, permanecer como parte de un vector que posee su propia maquinaria para autoreplicarse. La selección de la célula que ha incorporado cualquiera de las secuencias de la invención se lleva a cabo por medio de la adición de antibióticos al medio de cultivo que suministra nutrientes a las mismas. La resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia contenida en la secuencia del vector o del ADNt del vector.

Las células seleccionadas, si son vegetales, pueden someterse a un programa de organogénesis o embriogénesis somática mediante el cual, tras la desdiferenciación de las mismas mediante una combinación adecuada de hormonas vegetales y otros compuestos, se da lugar a una planta completa que contiene el material genético de la célula original de la que procede.

Otro aspecto de la presente invención es el uso del fruto de la invención para su consumo fresco y procesado industrial. Este fruto procede preferiblemente de las plantas de *Solanum lycopersicum* de la invención. Debido a las características funcionales del tomate de la invención, descritas a lo largo de esta solicitud, éste puede ser usado para su consumo fresco por las características organolépticas mejoradas con respecto a otros tomates comercializados y por su beneficio para la salud por la presencia de concentraciones elevadas de antioxidantes como el licopeno. Asimismo, el aspecto sorprendente y original del tomate de la invención le da ventaja sobre el resto de tomates, pudiéndose convertir en un elemento fundamental para el marketing del producto. Por otra parte, la ausencia de la zona de abscisión ofrece una ventaja importante a la recolección mecánica.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig 1. *Muestra la organización genómica del gen TAGL1 en tomate (tipo salvaje; Wild type).*

5 E1 a E8: Exones.

I1 a I7: Intrones.

10 Fig 2. *Muestra la organización genómica del gen TAGL1 en el mutante de inserción ALK.*

El T-DNA (ADN de transferencia) está compuesto por (por orden de aparición en la imagen):

LB: *Left Border*.

15

NOS-T: Región terminadora del gen Nopalina sintasa.

NOS-P: Promotor del gen de la Nopalina sintasa.

20 NPTII: Gen codificante de la Neomicina fosfotransferasa II. Genera resistencia a antibióticos aminoglicósidos (por ejemplo, kanamicina y geneticina).

35S: Promotor constitutivo procedente del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

25 NOS-T: Región terminadora del gen Nopalina sintasa.

NOS-P: Promotor del gen de la Nopalina sintasa.

GUS: Gen *repórter* de la beta-Glucoronidasa.

30

35S: Promotor constitutivo procedente del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) truncado y en orientación inversa con respecto a la transcripción del gen *TAGL1*.

35 Fig 3. *Muestra el proceso de detección del mutante ALK y la obtención de líneas homocigóticas y hemicigóticas ALK.*

Fig 4. *Muestra los sépalos de las líneas homocigóticas ALK convertidos en partes carnosas del fruto con características similares a las del fruto verdadero.*

40

Fig 5. *Muestra líneas homocigóticas y hemicigóticas de tomate ALK en las que el cáliz se convierte en fruto.*

A la izquierda se observan líneas homocigóticas para la mutación ALK, en el centro líneas hemicigóticas (idénticas al mutante original), y a la derecha líneas acigóticas (idénticas al WT). Se puede observar que la mutación es de tipo semidominante y, por tanto, desde un punto de vía fenotípico, los cambios más dramáticos ocurren en las plantas homocigóticas para la mutación.

45

Fig 6. *Muestra las flores de plantas mutantes y WT.*

50

A. Flores en estadio de botón floral (arriba, homocigótica para la mutación; abajo, acigótica).

B. Flores en un estadio previo a preantesis (arriba, homocigótica para la mutación; abajo, acigótica).

55 C. Flores en estadio de antesis (arriba, homocigótica para la mutación; abajo, acigótica). Obsérvese la coloración más intensa de los pétalos de las plantas homocigóticas.

Fig 7. *Muestra las flores de plantas acigóticas (izquierda) y homocigóticas ALK (derecha).*

60

En cada imagen se muestran 4 flores de tomate en diferentes estadios. De izquierda a derecha las flores están en los estadios BF1 (Botón floral estadio 1), BF2 (Botón floral estadio 2), PA (Preantesis) y A (Antesis).

65 Fig 8. *Muestra la ablación del estilo en flores homocigóticas para la mutación ALK respecto al WT (derecha).*

Fig 9. *Muestra el tamaño de las células en sépalos de plantas acigóticas (izquierda) y homocigóticas ALK (derecha).*

ES 2 341 527 B1

A la izquierda se muestra el cáliz y fruto de 1 cm de una planta acigótica.

A la derecha se muestra el cáliz y fruto de 1 cm de una planta homocigótica.

5 En las imágenes superiores la barra representa una longitud de 1 mm. En las imágenes inferiores la barra representa una longitud de 100 μm .

Los cortes histológicos de los sépalos se realizaron en un estadio de desarrollo del fruto de aproximadamente 1 cm de diámetro.

10

Ejemplos

A continuación se ilustra la invención mediante ejemplos que describen la obtención del nuevo cultivar así como su caracterización genotípica, fenotípica y el análisis de las características organolépticas más relevantes.

15

Ejemplo 1

Obtención del mutante de inserción ALK

20 El mutante de inserción ALK se obtuvo tras la integración de la secuencia SEQ ID NO: 1 corriente arriba de la secuencia codificante del gen *TAGLI* (Fig 1 y 2). La integración de SEQ ID NO: 1 en este sitio nucleotídico concreto del promotor, produjo una reorganización genómica de las señales de regulación en el extremo 5' del gen, siendo ésta la causa de la gama de cambios fenotípicos que son característicos del mutante ALK.

25 La estructura de este nuevo “elemento de regulación”, entendiéndolo como tal al que resultó de la integración de SEQ ID NO: 1 en la región de control en 5', generó dos cambios en el patrón de expresión del gen: por un lado, se produjo un mayor nivel de expresión y, por otro, una expresión ectópica. Por lo que respecta a esto último, tras el cuajado del fruto, en las plantas tipo salvaje, el gen se expresó a lo largo del desarrollo del fruto y su expresión aumentó en la fase de maduración. En cambio, en el mutante ALK el gen se expresó no sólo en el fruto, sino también en los sépalos convertidos en fruto. Es decir, el gen se expresó en una situación ectópica (i.e. en una localización diferente a la que es habitual).

30

El inserto tiene una estructura peculiar, que no es idéntica a la del ADNt original, debido a algún tipo de reordenación durante el proceso de integración. Además, el ADNt original se modifica en el interior de la planta e integra en una zona concreta del promotor del gen *TAGLI* pero de forma invertida, dando lugar a la secuencia SEQ ID NO: 1.

35

Por lo que se refiere a la estructura del inserto, el aspecto más llamativo a nivel molecular es que en el extremo derecho hay un promotor 35S truncado en dirección opuesta con relación a la transcripción del gen *TAGLI*.

40 El ADN de transferencia (ADNt) es un segmento del plásmido Ti (inductor de tumores) de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, que puede ser transferido a células vegetales, donde se integra en el genoma. El ADNt no contiene ningún gen importante para el proceso de transferencia, salvo dos cortas secuencias con repeticiones imperfectas situadas en sus bordes (LB y RB). Mediante manipulación genética se han sustituido las secuencias originales del ADNt del microorganismo, que convertían a la planta en una fábrica de nutrientes de *A. tumefaciens*, por otras que suelen permitir la selección del tejido o planta transformados y/o por genes de interés científico o biotecnológico (*NPTII*, genes marcadores u otros genes).

45

El ADNt no presenta preferencias de inserción ni a nivel cromosómico ni a nivel intragénico.

50 Tras la inserción del ADNt en el ADN contenido en las células vegetales de porciones de cotiledón, las células que eran capaces de expresar el ADN transferido fueron seleccionadas por medio del antibiótico kanamicina. El método de transformación empleado se ha desarrollado previamente (Pineda, B. (2005). Análisis funcional de diversos genes relacionados con la tolerancia a la salinidad y el estrés hídrico en plantas transgénicas de tomate [*Lycopersicon esculentum* Mill.] Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia). Brevemente, los explantes de cotiledón de plántulas axénicas de tomate se transfirieron a medio MO durante 48 horas. A continuación, los explantes se sumergieron durante 10 minutos en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*. Tras la inoculación, se realizó el co-cultivo en medio MO + 200 μM de acetosyringona (*3'5'-dimethoxy-4-hydroxyacetophenone*) durante 24 horas, realizando la incubación en oscuridad a 28°C. Para la eliminación de la bacteria, los explantes se trataron durante 10 minutos con una solución que contenía 500 mg/l de cefotaxima. Tras el lavado, los explantes se cultivaron en medio MO + cefotaxima (400 mg/l). A los 2-3 días, los explantes se transfirieron al medio selectivo MO + 100 mg/l de kanamicina y 300 mg/l de cefotaxima, realizando la incubación a 25 \pm 1°C con un fotoperíodo de 16 h Luz / 8 h oscuridad. Se precisaron varias transferencias al mismo medio selectivo para conseguir el desarrollo de brotes. Tras el enraizamiento, las plantas se propagaron clonalmente por vía axilar con el fin de disponer de varias copias del mismo genotipo.

60

65 De este modo se obtuvieron mutantes insercionales. El siguiente paso es la secuenciación de las secuencias corriente arriba y corriente abajo del sitio de inserción del ADNt. Para ello se diseñaron cebadores homólogos a los bordes del inserto, de modo que se puede amplificar la zona de intersección con el genoma, y cebadores específicos del gen de interés cuando se ha identificado. Para la clonación del gen etiquetado se utilizó la estrategia denominada “An-

ES 2 341 527 B1

chor-PCR" (Schupp *et al.* (1999). *BioTechniques* 26(5): 905-912), que el grupo de investigación de la Universidad de Almería utiliza de forma rutinaria para clonar las secuencias flanqueantes a inserciones de ADNt en tomate.

Los cambios fenotípicos observados en el mutante de inserción ALK no fueron idénticos a los que se obtuvieron al sobreexpresar el gen *TAGLI* bajo el control de un promotor 35S normal. De hecho, al evaluar diversas líneas de sobreexpresión (i.e. plantas transgénicas con el "cásete" de expresión p35s::*TAGLI*), se observó una gama de fenotipos dependiendo del número de copias y punto de inserción (efecto de posición). Algunas líneas de sobreexpresión (es decir, las obtenidas con el cásete p35s::*TAGLI*) exhibían un fenotipo similar aunque no idéntico al del mutante ALK. En general, los cambios fenotípicos fueron más extremos en las líneas de sobreexpresión que en las plantas homocigóticas ALK.

Ejemplo 2

Identificación del mutante ALK

Como se ha mencionado en el ejemplo anterior, el mutante de inserción ALK se obtuvo tras la integración de la secuencia SEQ ID NO: 1 (como parte de una secuencia de mayor tamaño perteneciente al resto del ADNt integrado) corriente arriba de la secuencia codificante del gen *TAGLI* (Fig 1 y 2). La integración en este punto de la secuencia descrita se llevó a cabo por transformación genética de plantas de tomate de la variedad SLDG2 mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Este microorganismo se encargó de transferir una secuencia de ADN (ADNt) que, tras sufrir una serie de cambios, se insertó (tal como se explica en la descripción), en una zona concreta de la secuencia reguladora de la expresión del gen *TAGLI*.

En la evaluación de una colección de transformantes primarios (TG1), se identificó un mutante al que se denominó ALK (Fig 3). En un primer momento, el carácter más notable del mutante era el desarrollo de sépalos suculentos, de mayor peso y tamaño, y de morfología similar al pericarpio del fruto (Fig 4). Los cambios en el patrón del desarrollo del cáliz del mutante eran claramente patentes en etapas posteriores a la antesis, principalmente tras el cuajado del fruto. El análisis fenotípico preliminar realizado en réplicas clonales de la planta TG1 original (i.e. hemicigótica) no reveló cambios en la arquitectura de la planta ni en los caracteres vegetativos con respecto a las plantas WT. El análisis mediante citometría de flujo indicó que la planta mutante original era diploide. Además, el mutante era fértil, lo cual nos permitió obtener las progenies TG2 (segregante) y TG3 (líneas homocigóticas y acigóticas), así como líneas hemicigóticas (obtenidas por cruce entre plantas homocigóticas y acigóticas; Fig 3 y 5) y llevar a cabo la caracterización genética correspondiente.

Ejemplo 3

Caracterización del mutante ALK

3.1. Caracterización genética del mutante ALK

La herencia del mutante ALK presentó el típico patrón mendeliano para un carácter controlado por un simple gen. Para determinar el modo de herencia se cultivaron 54 plantas de la progenie TG2 en el invernadero. De ellas, 14 tenían un fenotipo más extremo que el mutante original (Fig 5, izquierda), 30 tenían un fenotipo idéntico al del mutante original (Fig 5, centro) y 10 tenían fenotipo silvestre, lo que indica una herencia mendeliana para un rasgo de tipo semi-dominante (segregación 1:2:1; $\chi^2 = 1.26$; $P > 20\%$). Tras obtener la descendencia de las 54 plantas TG2, se analizó la presencia o ausencia del ADNt en la progenie de cada una de ellas mediante análisis de resistencia a la kanamicina. Se comprobó que la progenie de todas las plantas que exhibían fenotipo silvestre era siempre sensible a la kanamicina mientras que la progenie de plantas de fenotipo mutante segregaba 3:1 para el carácter resistencia a la kanamicina (correspondiendo a la descendencia de una planta hemicigótica para el inserto transgénico) o era completamente resistente al antibiótico (en el caso de plantas homocigóticas para el inserto transgénico).

Simultáneamente, para confirmar la herencia mendeliana del ADNt, se realizó un test de segregación de resistencia a la kanamicina *in vitro* sembrando 102 semillas de la progenie TG2 en medio selectivo (un medio base suplementado con 100 mg/l de kanamicina). De las 102 plántulas germinadas, 71 fueron resistentes a la kanamicina mientras que 31 fueron sensibles indicando la ausencia del transgén (segregación 3:1; $\chi^2 = 1.58$; $P > 20\%$). La inserción de una simple copia del ADNt había sido previamente confirmada mediante un análisis Southern (datos no mostrados).

Posteriormente, se aclimataron 40 plantas de la TG2 resistentes a la kanamicina para evaluar su fenotipo en el invernadero. Se observó que las 40 plantas aclimatadas mostraban, tal y como se esperaba, el fenotipo ALK. Las progenies de estas plantas eran acordes a lo esperado: no segregantes para el fenotipo mutante y resistencia a la kanamicina (i.e. progenie de una planta homocigótica) o con segregación 3:1 tanto para el fenotipo mutante como para la resistencia a la kanamicina (i.e. descendencia de una planta hemicigótica para el inserto).

Así pues, el análisis genético y la existencia de co-segregación ADNt-fenotipo confirmó que la mutación no era debida a variación somaclonal, sino que estaba asociada a la presencia de la inserción única del ADNt en un gen endógeno.

3.2. Caracterización fenotípica del mutante ALK

3.2.1. Los primeros cambios en el desarrollo del cáliz se detectan en las flores

5 La caracterización fenotípica del mutante ALK se realizó en líneas homocigóticas y acigóticas para la mutación, así como en líneas hemicigóticas obtenidas mediante cruces sexuales entre plantas acigóticas y homocigóticas (Fig 3).

Tal y como se ha descrito anteriormente, los cambios más significativos que se produjeron en el cáliz se detectaron tras el cuajado de los frutos. En este momento, los sépalos experimentaron un engrasamiento gradual en consonancia con el crecimiento del fruto y finalmente adquirieron una morfología similar al pericarpio del fruto. No obstante, ante la posibilidad de que en las plantas mutantes se produjera algún cambio en un estadio más temprano del desarrollo floral (e.g., botón floral, pre-antesis o antesis), analizamos flores de plantas homocigóticas para la mutación insercional ALK y las comparamos con las de plantas acigóticas cuyo fenotipo era idéntico al WT (Fig 6). De esta forma, se pudo comprobar que en estadios tempranos del desarrollo floral (botón floral y pre-antesis) los sépalos de las flores de plantas homocigóticas ALK desarrollaban más tricomas y de mayor longitud que los de las plantas acigóticas (Figura 6 A y B). Además, los extremos (parte distal) de los sépalos ALK eran de un color más oscuro y, para un mismo estadio de desarrollo, parecían más cortos que los del WT (Figura 6 B). Para verificarlo, se determinó la longitud y la anchura de los sépalos de flores homocigóticas, hemicigóticas y acigóticas (idénticas al WT) en cuatro estadios de desarrollo (BF1, BF2, preantesis y antesis). Aunque no se encontraron diferencias significativas en el estadio de BF1 (posiblemente porque el tamaño de las flores era demasiado pequeño para detectar diferencias), los datos revelaron que los sépalos de las flores ALK (tanto homocigóticas como hemicigóticas, entre las que no se detectaron diferencias significativas) eran de similar anchura pero de menor longitud que los sépalos de las flores del WT en los estadios de BF2, preantesis y antesis (Fig 7 y Tabla 1).

TABLA 1

Longitud de los sépalos de plantas acigóticas y homocigóticas ALK

| Estadio | Acigóticas | | | | Homocigóticas | | | |
|---------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | BF1 | BF2 | PA | A | BF1 | BF2 | PA | A |
| Longitud (mm) | 6,49 (0,56) | 13,01 (1,04) | 14,13 (0,58) | 13,57 (1,14) | 7,68 (0,74) | 10,45 (0,78) | 10,55 (0,67) | 10,18 (0,67) |

BF1: Botón Floral estadio 1. BF2: Botón Floral estadio 2. PA: Preantesis. A: Antesis. Nota: Entre paréntesis se indica la desviación estándar

El fenotipo de las flores homocigóticas ALK fue aún más extremo, caracterizándose por una coloración más intensa en el segundo (pétalos) y tercer verticilos (estambres) de flores en estado de antesis (Figura 6 C).

3.2.2. Los cambios más profundos que origina la mutación ALK se producen durante el desarrollo del fruto

La caracterización fenotípica de los efectos que produce la mutación ALK en los frutos permitió observar notables diferencias entre las plantas homocigóticas y hemicigóticas para la mutación, así como las que existían entre éstas y las plantas acigóticas (Fig 5). Se pudo comprobar que las plantas hemicigóticas para el inserto transgénico produjeron frutos de color y forma similar a los de plantas acigóticas, a excepción del cáliz, cuyo peso fresco fue 5 veces mayor (Tabla 2) y de color amarillo-verdoso o amarillo-anaranjado (Fig 5), en lugar de verde como ocurre en las plantas WT. En el caso de las plantas homocigóticas, el peso fresco del cáliz de los frutos maduros fue, por término medio, 8 veces mayor que el de los controles (Tabla 2), exhibiendo el cáliz un color rojo intenso (Fig 4 y 5).

TABLA 2

Peso fresco, peso seco y contenido en agua de los cálices de frutos maduros de plantas acigóticas, hemicigóticas y homocigóticas para ALK

| | Acigóticas | Hemicigóticas | Homocigóticas |
|------------------------|------------|---------------|---------------|
| Peso fresco (g) | 0,67±0,26 | 3,29±1,43 | 5,37±2,56 |
| Peso seco (g) | 0,10±0,05 | 0,28±0,11 | 0,51±0,23 |
| Cont. Agua (%) | 85,47 | 91,38 | 90,45 |

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Otro de los cambios relevantes en las plantas homocigóticas fue que los frutos maduros exhibían un color rojo más intenso que los de las plantas hemicigóticas y acigóticas. Además, los frutos de las plantas homocigóticas presentaban una morfología cordiforme con extremo puntiagudo, a diferencia de los frutos WT que eran predominantemente redondo-alargados (Fig 5). En este sentido, más del 60% de los frutos de las plantas homocigóticas, y un 15% de las hemicigóticas, tenía una morfología cordiforme, lo que no ocurría en los frutos de las plantas acigóticas. Para tratar de entender por qué los frutos de las plantas homocigóticas ALK adquirían morfología cordiforme se evaluaron flores de plantas homocigóticas y testigo en distintos estadios del desarrollo de la flor. No se detectó ninguna diferencia en la forma del ovario, pero se observó que, al iniciarse el cuajado del fruto, en las plantas testigo la ablación del estilo se produjo justo en el extremo estilar del ovario; en cambio, en las plantas homocigóticas sólo se eliminó una porción equivalente a unos dos tercios de la parte distal del estilo (i.e. la más próxima al estigma), desarrollándose el fruto con la parte basal del estilo y adquiriendo una morfología cordiforme (Fig 8).

Por otro lado, se pudo observar que las flores de las plantas homocigóticas desarrollaban una alteración en la zona de abscisión del fruto. De hecho, la zona de abscisión del fruto estaba parcialmente suprimida, por lo que el fruto no se separó de la planta como en las plantas WT.

Conviene resaltar que la supresión de la zona de abscisión del fruto es un carácter relevante en los cultivares de tomate utilizados para la industria, ya que en este tipo de cultivares la recolección no suele hacerse de forma manual, sino con maquinaria agrícola. De hecho, el mutante *jointless* de tomate (caracterizado también por la supresión de la zona de abscisión del fruto) se ha utilizado para la derivación de cultivares de tomate de industria adaptados a la recolección con maquinaria agrícola.

3.2.3. Los sépalos del mutante ALK se convierten en órganos semejantes a un fruto

Tal y como se ha mencionado antes, los sépalos de las plantas hemicigóticas y homocigóticas para la mutación experimentaron un dramático incremento de peso fresco (5 y 8 veces mayor, respectivamente) con respecto a los de las plantas acigóticas (Tabla 2).

Además, los sépalos de las plantas homocigóticas se tornan de color rojo, tal y como ocurre en el fruto verdadero (Fig 4 y 5). Este proceso de maduración no ocurrió en las plantas hemicigóticas en las que los sépalos aumentaron su tamaño pero no viraron a color rojo (Fig 5). Esto indica que, por lo que respecta a los sépalos, el efecto de la mutación insercional es de tipo semidominante.

Además, los sépalos de las plantas ALK acumularon más agua que los del testigo. En concreto, no observamos diferencias significativas en el contenido en agua de los cálices de las plantas homocigóticas y hemicigóticas, pero sí existían diferencias entre las plantas de fenotipo mutante y las de fenotipo silvestre (Tabla 2). Además, el incremento de peso fresco no se debió sólo a la absorción de agua, sino también a un aumento de peso seco (3 y 5 veces mayor en las plantas hemicigóticas y homocigóticas con respecto a las acigóticas, respectivamente).

Los cortes histológicos en los sépalos del mutante indicaron claramente que, al igual que ocurre en un fruto verdadero, se produce un engrasamiento dramático de las células (Fig 9). Además, la comparación entre los cortes transversales de un sépalo normal (i.e. de una planta acigótica o WT) y un sépalo de una planta homocigótica sugiere que en este último no sólo se ha producido un engrasamiento de las células, sino también un cambio en la identidad celular. De hecho, los estudios de microscopía electrónica (SEM) revelaron estos cambios de identidad celular (datos no mostrados) y demostraron que el cáliz de una flor tipo ALK se convierte en un órgano similar al fruto verdadero.

Los sépalos de las plantas homocigóticas ALK maduraron y viraron a rojo, al igual que ocurre en un fruto verdadero. La capacidad de los sépalos de las plantas homocigóticas ALK para experimentar un proceso de maduración está asociada a la liberación de etileno (Tabla 3). De hecho, conviene resaltar que los sépalos de las plantas homocigóticas ALK producen más etileno que los propios frutos.

ES 2 341 527 B1

TABLA 3

Liberación de etileno (nL/gr de peso fresco) en los sépalos y frutos de plantas acigóticas (idénticas al WT), y homocigóticas ALK

| | Sépalos | Frutos |
|---------------------|------------|-----------|
| acigótica | 0,00±0,00 | 2,71±0,45 |
| homocigótica | 21,02±6,18 | 6,44±1,13 |

El cambio de color en los sépalos de las plantas homocigóticas ALK se debió a la acumulación de licopeno (Tabla 4), tal y como ocurrió en el pericarpio del fruto. De hecho, el contenido de licopeno en el cáliz convertido en fruto de las plantas homocigóticas ALK ($30,01 \pm 6,21$) fue incluso mayor que el del fruto verdadero de plantas acigóticas ($26,13 \pm 4,71$). Esto sugiere que los sépalos de estas plantas experimentaron un proceso de maduración similar al del fruto.

Más interesante aún es la capacidad que tuvieron los sépalos para acumular glucosa y fructosa (Tabla 5).

TABLA 4

Contenido en azúcares, carotenoides y flavonoides en los frutos verdaderos de plantas acigóticas (idénticas al WT), hemicigóticas ALK y homocigóticas ALK

| | Glucosa (mg/g PF) | Fructosa (mg/g PF) | Carotenoide s (mg/g PF) | Licopeno (mg/g PF) | Flavonoide s (mg/g PF) |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Fruto acigótica | 3,34±0,56 | 4,37±0,44 | 27,51±8,11 | 26,13±4,71 | 7,77±0,93 |
| Fruto homocigótica | 4,65±0,54 | 8,37±0,64 | 29,73±10,02 | 28,24±6,67 | 8,48±1,07 |
| Fruto hemicigótica | 10,70±0,66 | 11,26±0,72 | 16,66±5,33 | 15,62±5,13 | 9,41±1,01 |

ES 2 341 527 B1

TABLA 5

Contenido en azúcares, carotenoides y flavonoides en los sépalos de plantas acigóticas (idénticas al WT), hemicigóticas ALK y homocigóticas ALK

| | Glucosa (mg/g PF) | Fructosa (mg/g PF) | Carotenoide s (mg/g PF) | Licopeno (mg/g PF) | Flavonoide s (mg/g PF) |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Cáliz acigótico | 0,15±0,02 | 0,25±0,04 | 0,40±0,27 | 0,08±0,05 | 41,02±12,1 3 |
| Cáliz homocigótico | 6,62±0,63 | 10,88±0,70 | 31,57±9,98 | 30,01±6,21 | 26,07±10,0 3 |
| Cáliz hemicigótico | 2,82±0,40 | 4,58±0,10 | 8,07±1,01 | 1,31±0,66 | 18,58±3,33 |

Además, los sépalos de las plantas homocigóticas tenían un aroma indistinguible del que desprendían los frutos verdaderos.

En conjunto, los procesos de expansión celular, acumulación de agua y materia seca, así como la existencia de una actividad sacarolítica, con la subsiguiente acumulación de glucosa y fructosa, indican que el sépalo de las plantas homocigóticas ALK actúa como, o adquiere las propiedades de, un sumidero, tal y como sucede en el fruto verdadero.

Merece la pena resaltar que en muchas de las flores de las plantas homocigóticas en las que no ocurrió el cuajado del fruto se produjo el engrasamiento y la posterior maduración de los sépalos (Fig 4). Esto indica que en las plantas homocigóticas ALK, el proceso de conversión del sépalo en un órgano semejante a fruto es independiente de la conversión del ovario en fruto y que aquél es capaz de actuar como sumidero con independencia de si el fruto cuaja o no.

Asimismo, se observó que, en un elevado número de flores en las que se produjo el cuajado de fruto, la maduración de los cálices no ocurrió de forma sincronizada con la del fruto. En este sentido, en algunas inflorescencias se podían ver frutos verdes con sépalos rojos mientras que en otras ocurría lo contrario. Esto indica, de nuevo, que los sépalos ALK son capaces de actuar como sumideros independientes de los frutos verdaderos.

3.2.4. Los frutos y los sépalos convertidos en fruto de las plantas ALK tienen mayor calidad tanto para el consumo en fresco como para la industria

El fruto verdadero de las plantas hemicigóticas ALK tiene mayor calidad que el fruto verdadero de las plantas acigóticas. En efecto, como puede verse en la Tabla 4, el contenido en glucosa y fructosa de los frutos de las plantas hemicigóticas ($10,70 \pm 0,66$ y $11,26 \pm 0,72$, respectivamente) fue casi el triple que el de las plantas acigóticas ($3,34 \pm 0,56$ y $4,37 \pm 0,44$, respectivamente). Además, el contenido en sólidos solubles de los frutos de las plantas hemicigóticas ($11,00 \pm 0,55$) fue mucho mayor que el de las plantas acigóticas ($4,20 \pm 0,10$).

De forma similar, conviene resaltar que el cáliz convertido en fruto de las plantas homocigóticas ALK tuvo un contenido en glucosa y fructosa ($6,62 \pm 0,63$ y $10,88 \pm 0,70$, respectivamente) que fue prácticamente el doble que el del fruto verdadero de las plantas acigóticas ($3,34 \pm 0,56$ y $4,37 \pm 0,44$, respectivamente). Además, el contenido en sólidos solubles de los cálices convertidos en frutos de las plantas homocigóticas ($9,60 \pm 0,40$) fue mucho mayor que el de los frutos verdaderos de las plantas acigóticas ($4,20 \pm 0,10$) (Tabla 5).

Asimismo, a continuación se muestran los grados Brix (sólidos solubles) que se obtienen en frutos de plantas tipo salvaje ("wild type"), y tanto hemicigóticas como homocigóticas para la mutación ALK.

ES 2 341 527 B1

TABLA 6

Contenido en grados Brix

| | Tipo salvaje | Hemicigotos ALK | Homocigotos ALK |
|---------|--------------|-----------------|-----------------|
| Sépalos | 0,25 ± 0,00 | 4,05 ± 0,05 | 9,60 ± 0,40 |
| Fruto | 4,20 ± 0,10 | 11,00 ± 0,55 | 7,35 ± 0,25 |

En definitiva, tanto los frutos verdaderos de las plantas hemicigóticas como los cálices convertidos en frutos de las plantas homocigóticas ALK tenían mayor calidad que los frutos de la línea original tanto para el consumo en fresco como para la industria.

Por lo que respecta a este último punto conviene resaltar que en los cultivares actuales de tomate utilizados para la industria el contenido en sólidos solubles no supera los 5,5 - 6,0° Brix. En cambio, en los frutos verdaderos de las plantas hemicigóticas y en los cálices de las plantas homocigóticas ALK el contenido en sólidos solubles alcanzó unos valores muy superiores (11,0 y 9,7, respectivamente). Por este motivo, tanto los frutos como los cálices de las líneas ALK podrían especialmente adecuados para el procesado industrial.

3.2.5. Las plantas ALK tienen mayor capacidad de cuajado del fruto

A fin de analizar el efecto que produjo la mutación ALK sobre caracteres relacionados con la producción se cultivaron plantas homocigóticas, hemicigóticas y acigóticas y se contabilizó el número de flores y frutos cuajados hasta la séptima inflorescencia, así como el peso del fruto y la producción total.

No se observaron diferencias en el tiempo de floración de las plantas ALK con respecto a las acigóticas (datos no mostrados). En cambio, las plantas hemicigóticas y homocigóticas ALK exhibieron un ligero aumento en el número de flores por inflorescencia, lo que se apreció mejor cuando se observó el número de flores acumulado hasta la séptima inflorescencia (Tabla 7). Además, las plantas ALK produjeron un mayor número de frutos (más del doble en las homocigóticas) que sus correspondientes testigos (plantas acigóticas). Cuando se comparó la variación en el número de frutos y de flores se apreció que el mayor número de frutos en las plantas mutantes no se explicaba por el mayor número de flores que se desarrollan en estas plantas (Tabla 6). Los resultados indicaban, pues, que el mayor número de frutos se debía a una mayor tasa de cuajado de fruto en las flores de las plantas ALK.

TABLA 7

Nº de flores y nº de frutos hasta la séptima inflorescencia

| | Nº de flores | Nº de frutos |
|----------------------|--------------|--------------|
| Acigóticas | 47,67 | 21,00 |
| Hemicigóticas | 58,75 | 38,25 |
| Homocigóticas | 56,75 | 46,25 |

De hecho, los porcentajes de cuajado de flor a fruto en las plantas testigo (acigóticas) y en las plantas ALK (hemicigóticas y homocigóticas) fueron los siguientes: 44% (acigóticas), 62% (hemicigóticas) y 81% (homocigóticas). Es decir, en las plantas homocigóticas ALK la tasa de cuajado de cuajado de fruto fue casi el doble que en las plantas WT.

En las plantas hemicigóticas la mayor tasa de cuajado de fruto, y por tanto el mayor número de frutos por planta, compensó el menor peso medio del fruto y esto explicaba que su producción fuese similar a la de las plantas acigóticas (Tablas 8 y 9).

TABLA 8

Peso medio de los frutos hasta la séptima inflorescencia

| Peso medio | Fruto | Sépalo | Fruto+sépalo |
|----------------------|-------|--------|--------------|
| Acigóticas | 35,22 | 0,66 | 35,89 |
| Hemicigóticas | 16,60 | 3,25 | 19,85 |
| Homocigóticas | 9,60 | 4,47 | 14,07 |

TABLA 9

Peso total de los frutos hasta la séptima inflorescencia

| Peso total | Frutos | Sépalos | Frutos+sépalos |
|----------------------|--------|---------|----------------|
| Acigóticas | 703,68 | 14,48 | 718,16 |
| Hemicigóticas | 619,89 | 126,42 | 746,30 |
| Homocigóticas | 427,51 | 207,99 | 635,50 |

En cambio, las plantas homocigóticas tuvieron menor producción que las acigóticas, lo cual se debió al descenso en el peso medio del fruto verdadero (Tabla 8). Sin embargo, puesto que los sépalos de las plantas mutantes constituyen un sumidero alternativo al del fruto verdadero, a la hora de estimar la “producción total” de estas plantas se debería haber tenido en cuenta no sólo el peso de los frutos verdaderos, sino también el de los sépalos convertidos a frutos. Cuando se estimó esta nueva componente de producción (frutos verdaderos más sépalos convertidos en frutos) no se apreciaron diferencias significativas entre las plantas homocigóticas y las acigóticas (Tabla 9).

Esta componente de “producción total” estaba subestimada en las plantas homocigóticas por la forma de llevar a cabo este ensayo. En efecto, en el experimento en cuestión sólo se pesaron los frutos (y los sépalos convertidos en frutos) en aquellas flores que habían cuajado un fruto verdadero. No se recolectaron en cambio los sépalos convertidos a fruto en las flores que no habían cuajado fruto verdadero. Teniendo en cuenta el gran número de flores de las plantas homocigóticas en las que se produce este fenómeno (cuajado de sépalos, pero no de frutos verdaderos) es muy probable que si se incluyera el peso de los mismos en la “producción total”, el valor obtenido en las plantas homocigóticas habría sido superior al estimado.

El ensayo antes mencionado se realizó con plantas acigóticas, hemicigóticas y homocigóticas para la mutación insercional en el fondo genético de un cultivar de crecimiento determinado (SLDG2). Los datos sobre número de flores y frutos se tomaron hasta la séptima inflorescencia y, a fin de controlar la tasa de cuajado de fruto en las flores de cada inflorescencia, las plantas se sometieron a una poda de forma que el crecimiento fuera similar al de una planta de tipo indeterminado. Teniendo en cuenta que la forma de llevar a cabo el cultivo podría afectar tanto a los datos de cuajado como de producción, se realizó un nuevo experimento con líneas acigóticas, hemicigóticas y homocigóticas para la mutación ALK, pero en este ensayo el cultivo de las plantas se llevó a cabo respetando el hábito de crecimiento determinado del cultivar en cuestión. Los resultados obtenidos en este nuevo ensayo fueron totalmente coherentes con los del experimento anterior en el sentido de que la tasa de cuajado de fruto fue mayor en las líneas hemicigóticas y homocigóticas ALK. Es decir, el aumento de cuajado que produjo el mayor nivel de expresión del gen *TAGL1* en las líneas ALK era independiente del sistema de cultivo.

En todo caso, los datos más contundentes al respecto se obtuvieron en un experimento en el que se anuló la expresión del gen endógeno *TAGL1* mediante la técnica RNAi. El experimento de anulación de función de *TAGL1* se realizó en dos cultivares de tomate: SLDGO (crecimiento determinado) y Moneymaker (crecimiento indeterminado). En el primer caso, la tasa de cuajado de fruto en las líneas RNAi fue 5 veces menor ($72,22 \pm 14,86$ frutos en SLCD2 *versus* $15,50 \pm 8,14$ en las líneas RNAi). En el segundo, la tasa de cuajado de fruto fue casi 4 veces menor ($48,00 \pm 12,38$ frutos en Moneymaker *versus* $18,60 \pm 11,89$ frutos). En definitiva, los resultados mostraron que la anulación de función de *TAGL1* redujo la tasa de cuajado de fruto en ambos cultivares, SLGD2 (crecimiento determinado) y Moneymaker (crecimiento indeterminado).

ES 2 341 527 B1

La mutación insercional ALK generó un mayor nivel de expresión del gen *TAGL1* y ello explica que en las líneas hemicigóticas y homocigóticas ALK la tasa de cuajado de fruto sea mayor. En todo caso, y con independencia de la causa subyacente a nivel molecular, el aumento en la tasa de cuajado de fruto es independiente de las características de crecimiento (determinado o indeterminado) de los cultivares de tomate.

5

3.2.6. La mutación ALK produce cambios en los caracteres reproductivos pero no afecta a los caracteres vegetativos

10 Con el fin de esclarecer si la mutación ALK producía algún efecto sobre el desarrollo vegetativo y la arquitectura de las plantas se procedió a una caracterización de la forma y tamaño de las hojas y se contabilizó el número de fitómeros del segmento inicial (desde la base hasta la primera inflorescencia) y de los sucesivos segmentos simpodiales (desde la primera hasta la séptima inflorescencia), así como la longitud de cada uno de los fitómeros. Pese a las exhaustivas mediciones no se encontraron diferencias significativas en la arquitectura de la planta ni en los restantes caracteres
15 vegetativos (datos no mostrados).

Así pues, los datos globales indicaron que la mutación ALK afectaba básicamente a caracteres de tipo reproductivo, especialmente al patrón de desarrollo de la flor (conversión de sépalos en fruto), y al cuajado, desarrollo y maduración del fruto, pero no tenía efecto sobre la arquitectura y los caracteres vegetativos de las plantas.

20

3.2.7. La mutación ALK se expresó en otras variedades de tomate

La mutación ALK se detectó en una línea de tomate de crecimiento determinado (SLDG2). Para comprobar si el efecto que produce la mutación ALK era el mismo en otras variedades de tomate, se realizó el cruce sexual entre plantas homocigóticas ALK y plantas de los cultivares “p73” (semideterminado) y “Moneymaker” (indeterminado). La descendencia de ambos cruces (hemicigótica) exhibía cambios en el patrón de desarrollo de los sépalos idénticos a los que se observaron en la línea hemicigótica ALK de SLDG2 (Fig 3 y 5). El color de los cálices de las plantas procedentes de ambos cruces fue amarillo-verdoso o amarillo-anaranjado en lugar de verde, como ocurría en las plantas
30 WT. En el caso concreto del cruce con p73 (hemicigótico respecto a la mutación), el peso fresco del cáliz fue 8,5 veces mayor que el del testigo (p73), lo que parecía indicar que la mutación se expresaba en esta variedad con mayor intensidad, si cabe, que en la línea en la cual se detectó el mutante ALK (SLDG2). Tras cultivar la descendencia del cruce entre p73 x ALK se observó la segregación esperada (¼ plantas homocigóticas: ½ hemicigóticas: ¼ tipo salvaje) y se pudo comprobar que las plantas homocigóticas desarrollaban frutos con cálices rojos y de mayor tamaño que los
35 de las plantas hemicigóticas. Además, estos frutos exhibían una morfología cordiforme, al igual que ocurría en las plantas homocigóticas ALK de la variedad SLDG2.

Los datos obtenidos en las plantas hemicigóticas y homocigóticas de “Moneymaker” son similares a los descritos para el cultivar p73 (datos no mostrados).

40

Los resultados indican, pues, que el efecto que produce la alteración (aumento de expresión) del gen *TAGL1* en el mutante insercional ALK es independiente del patrón de crecimiento (determinado, semideterminado o indeterminado) de las plantas de tomate. Así pues, las características deseables descritas en el mutante ALK original se pueden transferir a cualquier otro cultivar de tomate mediante cruzamiento sexual o, alternativamente, empleando un método
45 de transformación genética que permita la introducción y expresión del gen *TAGL1* modificado en el mutante ALK.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Secuencia de nucleótidos que comprende:

- 5 a. Una secuencia que comprende SEQ ID NO: 1 unida por su extremo 3' a
b. una secuencia reguladora de la expresión génica,

10 donde la secuencia de nucleótidos es capaz de incrementar la expresión de un gen.

2. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 donde la secuencia reguladora de la expresión génica del apartado (b) es SEQ ID NO: 2.

15 3. Secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde la secuencia reguladora de la expresión génica se une por el extremo 3':

- 20 a. al extremo 5' de SEQ ID NO: 3 o
b. al extremo 5' de cualquiera de las secuencias con, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 3.

4. Secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

25 5. Vector que incluye la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Célula que comprende la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Célula que comprende el producto de la expresión de la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a

5.

30 8. Polen que comprende la célula según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7.

9. Planta que contiene la célula según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7.

35 10. Planta según la reivindicación 9 que pertenece a la especie *Solanum lycopersicum*.

11. Fruto y sépalos convertidos en fruto de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10.

40 12. Germoplasma de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10.

13. Método para la construcción del vector según la reivindicación 5 que comprende:

- 45 a. Seleccionar cualquiera de las secuencias de la invención,
b. insertar la secuencia del apartado (a) en un vector y
c. seleccionar el vector obtenido según el apartado (b).

50 14. Método para la obtención de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 que comprende:

- 55 a. Obtener una célula de una muestra biológica,
b. transformar la célula del apartado (a) con un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención y
c. seleccionar la célula transformada según el apartado (b).

60 15. Uso del fruto y de los sépalos convertidos en fruto según la reivindicación 11 para su consumo fresco y procesado industrial.

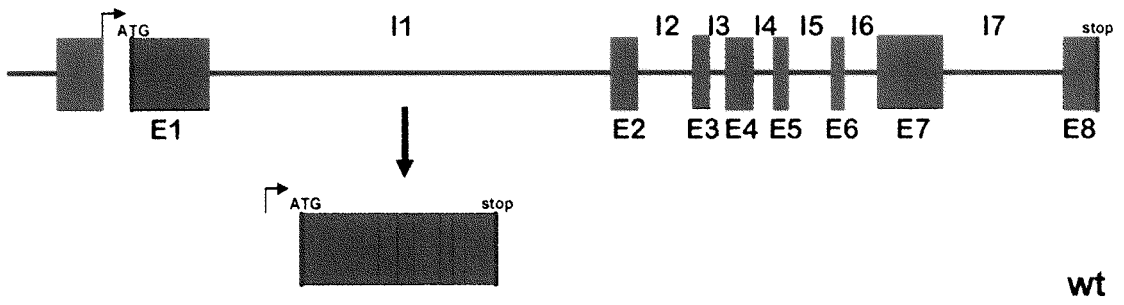


FIG. 1

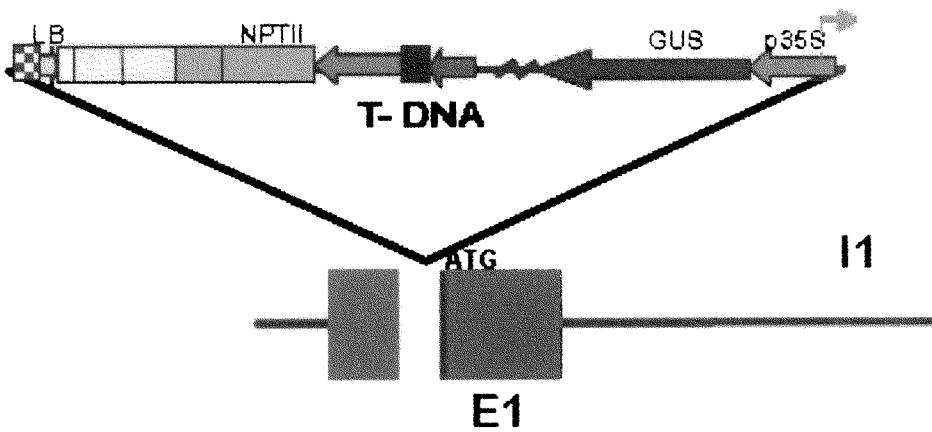


FIG. 2

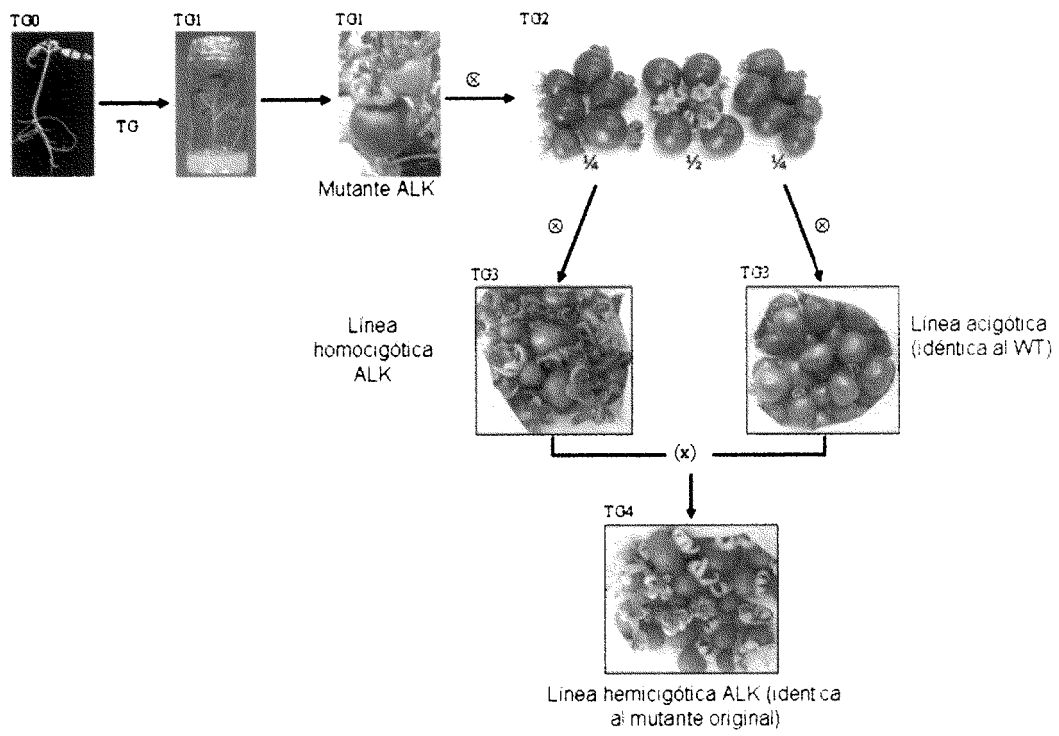


FIG. 3



FIG. 4

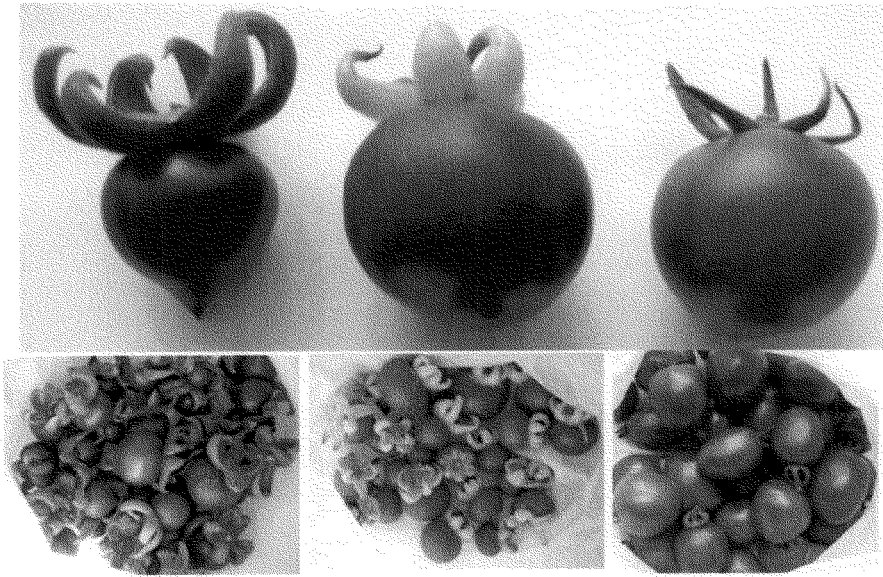


FIG. 5

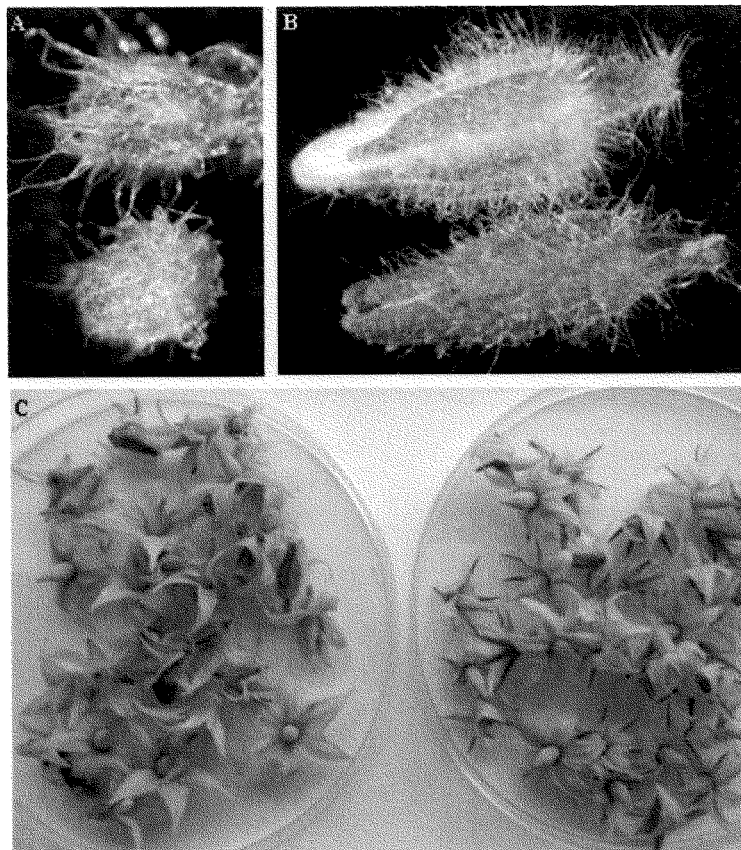


FIG. 6

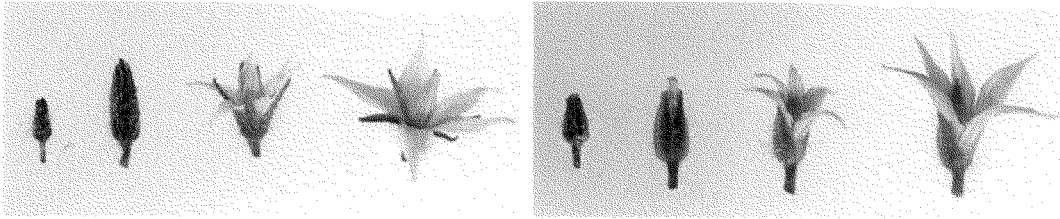


FIG. 7

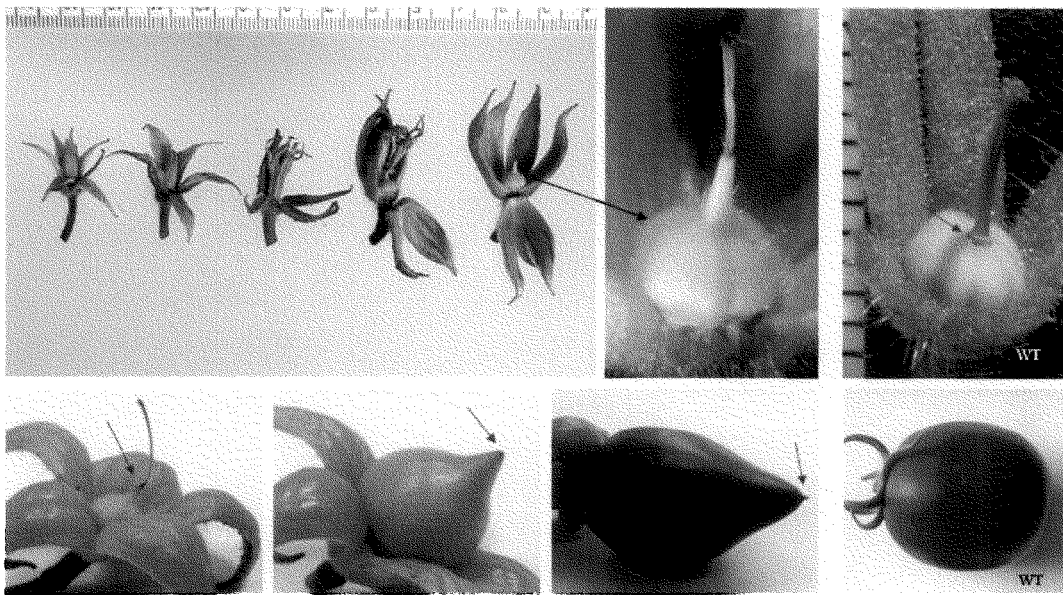


FIG. 8

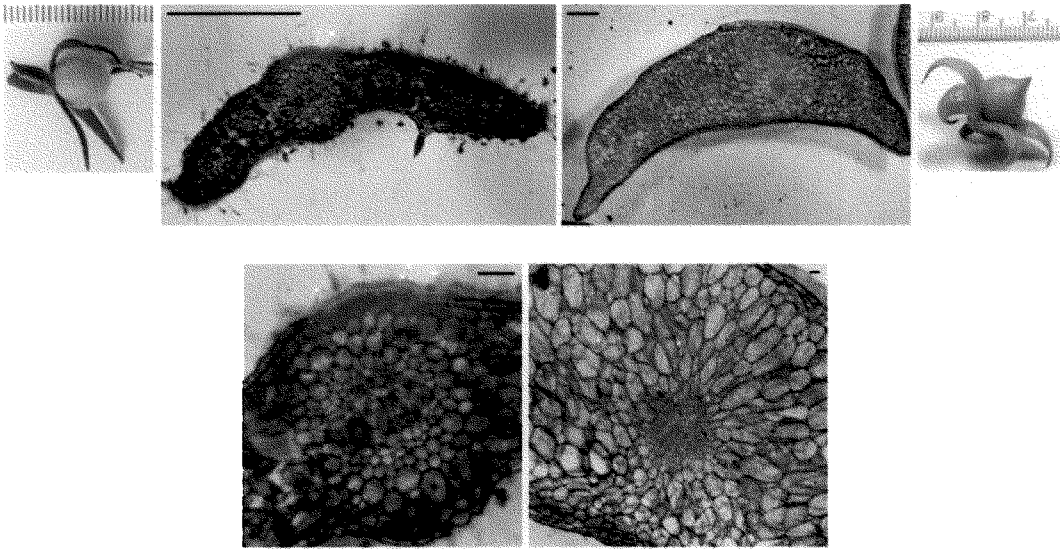


FIG. 9

ES 2 341 527 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Politécnica de Valencia - CSIC

5 <120> Nuevo cultivar con frutos y sépalos convertidos en frutos de alto interés para su consumo fresco y procesado industrial

<130> 1598.5

10

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 373

<212> DNA

20

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia parcial del promotor 35S

25

<400> 1

30 aagggactga cctacccggg gatcgatcct ctagctagag tcgaggtccc ctccaaatga 60
aatgaacttc cttataaaga ggaaggggtct tgcgaaggat agtgggattg tgcgtcatcc 120
cttacgtcag tggagatatac acatcaatcc acttgctttg aagacgtggt tggaaactgtct 180
35 tctttttcca cgatgttcct cgtgggtggg ggtccatcct tgggaccact gtcggtagag 240
gcatcttgaa cgatagcctt tcctttatcg caatgatggc atttgtagaa gccatcttcc 300
ttttctactg tcctttcgat gaagtgcag atagctgggc aatggaatcc gaggaggttt 360
40 cccgatatta ccc 373

<210> 2

45

<211> 104

<212> DNA

<213> *Solanum lycopersicum*

50

<400> 2

agactataat ttccctgatt gagtgtgtaa ttagctaac gagatcgcga tatttgtttt 60
55 gcttttttca gttttttttt ttcttctttt cgatacaaga cgat 104

<210> 3

60

<211> 861

<212> DNA

<213> *Solanum lycopersicum*

65

ES 2 341 527 B1

<400> 3

| | | |
|----|--|-----|
| | atgggtttttc ctattaatca ggaattactt gtcgatgagt cgtcttctca gttgagaaaa | 60 |
| 5 | acaagtggag gaactggtgg aggaggtaga gggagattg aaattaaag gatcgaaaat | 120 |
| | acgacaaatc gacaagttac gttctgcaag cgtagaaatg ggctattgaa aaaagcttat | 180 |
| 10 | gaactttctg ttctttgtga tgctgaagtt tctaattg tattttccag ccgcgccgt | 240 |
| | ctctatgaat atgccaataa cagtgttagg gcaactattg ataggtacaa gaaacaccat | 300 |
| | gctgattcca ctagtactgg atctgtttct gaagctaaca ctcagtacta ccagcaagaa | 360 |
| 15 | gcatccaaac tgcgacgaca aattcgagat atacagactt ataacaggca aatagttgga | 420 |
| | gaggcattgg gcagtttaag ccctagagac ctcaagaatt tggaagggaa acttgaaaag | 480 |
| 20 | gccattggta gagtccgttc caaaaagaat gaattgcttt tctcagaaat agagctcatg | 540 |
| | caaaagaggg agattgagct gcagaacgcc aacatgtatc tacgcgcaa gatagcagag | 600 |
| 25 | gtagagagag cacaagagca aatgaacttg atgcctggag gcggaggcgg aggcggaggc | 660 |
| | ggaggaggag gaggatctga tcatcaatac catcatcagc caaattacga agatgctcgc | 720 |
| | aataacttcc tgcctgtaaa tctcctggaa ccaaactctc attactctcg tcgcgacaat | 780 |
| 30 | gctgataatc atggagcagg tattctgaaa tttgggggtca aggctcttca tcttcagaaa | 840 |
| | aatgtgtact acaattttta a | 861 |

35 <210> 4

<211> 10408

<212> DNA

<213> *Solanum lycopersicum*

40

45

50

55

60

65

ES 2 341 527 B1

<400> 4

| | | |
|----|--|------|
| | aatgcctgca tagaagtttg attatttcag atttcgcgat gcataggcac cattcgagag | 60 |
| 5 | gggggaaggt tccctacaat gaatTTTTTc atactagggc tcagatttca gacctctgtt | 120 |
| | taatggatga gcaaccccat ccgctgtaca tcatcctttg gtggtggatc taccgactac | 180 |
| 10 | actaattaat tttaaaaaca aagTTTTTTT tatcacaat cagtgagaaa tttatgctat | 240 |
| | aaaacatgat ttcccacaaa actagcttta cgtgtaaaaat acatgatgaa aataactaat | 300 |
| | tttcaactgta atagtgaaaa acttcttaat atttccatat gaaatgatta ttatTTTTTc | 360 |
| 15 | TTTTgtcact ggttcaatta aaatatctac aaaaataatc actgaatatc tttcaatgag | 420 |
| | aaatTTtagtg caagaataat gatTTTctag tagtataact aagtatattg ttgttgtttt | 480 |
| 20 | ccatttacac gtctcttaag aaacattaat taatagaaat attgaaactat tttacccttt | 540 |
| | ataatatcac gataactaat ttgagacgaa gaatagttta gtagtgtata gatatacact | 600 |
| | caaaaagtag tatatTTtag ttggacggtc caatTTTTTc ctatctataa ctatcctcca | 660 |
| 25 | gcttgttcaa ctcaactcca ttttctgcaa gctctcctgt tcaaacctat acaaaatagg | 720 |
| | aacaaatttg aagagaaaaa aataaaaaaa aatctctaag gtagatTTTc tttctttctt | 780 |
| | tctatacca atctttgcta tatcgccatt ttttcttaa ttttaataat gaaaattggt | 840 |
| 30 | gttttttctt cttttggatg ctacaaacac atacacaaaa atatTTTtaa ttttttttg | 900 |
| | ttagactata atttccctga ttgagtgtgt aatTTtagcta acgagatcgc gatatttggt | 960 |
| 35 | ttgctTTTTt cagTTTTTTt ttttcttctt ttcgatacaa gacgatatgg ttttctctat | 1020 |
| | taatcaggaa ttacttgtcg atgagtcgtc ttctcagttg agaaaaacaa gtggaggaac | 1080 |
| | tggtggagga ggtagagggg agattgaaat taaaaggatc gaaaatacga caaatcgaca | 1140 |
| 40 | agttacgttc tgcaagcgta gaaatgggct attgaaaaaa gcttatgaac tttctgttct | 1200 |
| | ttgtgatgct gaagTTTcac taattgtatt ttccagccgc ggccgtctct atgaatatgc | 1260 |
| | caataacagg tttgTTTatt taattctttt tttctctaac aagatctggt tttaaccta | 1320 |
| 45 | atgaaaaaaa aaaatgtgat tctgcagatc tttgcctttt gtgtatgttt ttttttgatt | 1380 |

50

55

60

65

ES 2 341 527 B1

| | | | | | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| | tgggtatfff | tgtaatcggg | gattgcttag | atgataagca | ctcttaagat | tatgagttcg | 1440 |
| | tgggtcaatat | aggagctcgt | aacgattgat | ctatgtcagt | ctagatatat | ttgtgtgtta | 1500 |
| 5 | aaaagagggt | gactatgggtg | tttatttaag | ttaaaagatt | gagtttcttc | catcaciaag | 1560 |
| | atftgcttgt | ctaatccata | atftftftft | gtttcctttc | tttatgagct | tcaaaaaaac | 1620 |
| | caaattttcc | tttgattcta | caaatagatc | cgttgatttg | agtcgagaaa | tcggttatta | 1680 |
| 10 | atattggttc | taaacttggt | tggagtagca | ttctttctag | aattttgatt | aaacagagat | 1740 |
| | atfttgtgtg | tcgactatct | agatatagat | tcttatcggg | ataatacata | tattggatcc | 1800 |
| 15 | taaacgtggc | tttaatttta | actttgatct | ccaactttca | taatgcagca | cattaataat | 1860 |
| | ccaattftft | tttaaaataa | acacatgagt | cctacatgaa | acaatacacg | taagacacca | 1920 |
| | tgtaggacia | aaaatgactt | gtaggacatg | tgtgtctatt | tgttcaactt | tatacaaatt | 1980 |
| 20 | taagtattta | tttgataaca | ttcaaaatta | aagaatataa | atgtaattcg | aaaaatcttg | 2040 |
| | ataaatttac | aagtaggggt | aaagagagat | agggaaaaat | cttaagctta | caaaatttat | 2100 |
| 25 | ttcccctftt | ctctctgtct | ctatftftft | ttgggcatct | ttgcagctag | taaattfttc | 2160 |
| | tctctcttcc | caatftftft | tgtttgtctg | taagctgtca | agttctgatt | tattfttcaat | 2220 |
| | caactcttcc | aattgatgct | tccttaatat | atataacatg | tcatttcaga | catcacacia | 2280 |
| 30 | gcaatagcct | atcagattac | agattagggt | ttcaggttac | accaaagag | tcaagttgct | 2340 |
| | ttftctftft | caaagttagg | atftftftft | tctfttggtga | agcgaaggga | tcgaactctc | 2400 |
| 35 | agtaataaag | tgaagttaa | aatagttctt | tggaaaaaaa | gagaaacttt | ttcaactcgt | 2460 |
| | cataattgaa | ttaggattat | ttttacaagc | aaagcaattt | ctttctgact | agagggagtt | 2520 |
| | actcagttgg | taaacattct | tcactttcaa | ttttaatatt | gttttgctt | tgtttttacc | 2580 |
| 40 | attatagcct | ttcaataaca | gagatagaaa | ttftfttgftt | ctaggttata | tatatatata | 2640 |
| | tatatatatac | caaaatftta | aacacaaaaa | caaactftta | gaaaaaaaat | tactaattftt | 2700 |
| | tatcaacccc | ttftgtatct | cctctcccc | cccttacttt | gtaattgagg | aaaggacaaa | 2760 |
| 45 | aacccccctt | ctctfttgatt | gggggatata | tataatftta | tcaaatatat | agggctcaat | 2820 |
| | taaaattatt | gaattctaat | aaactcatac | cattftctfta | gaattcagta | atftttaattg | 2880 |
| 50 | agccttatat | atftgataaa | actaccccgt | tgtctcaatt | tatgcaaaga | ggctcaaaat | 2940 |
| | acaatagttc | aaatatttat | ttfttaattaa | attatgaatt | aaagtatata | ttftfttaaaa | 3000 |
| | tatacaaaat | ataaatcaac | atattgaata | ttcaaaatat | ttaacaaatt | agtgtgagaa | 3060 |
| 55 | aattacacta | aaaagaaaaa | atctgtcaca | ctctcctaga | tataaacact | tcgtataaaa | 3120 |
| | tgggatagaa | aaaatataaa | taattaattc | tcacactcta | tatatatcaa | ataagtgata | 3180 |
| | gtcacaagtc | gaagagatag | agaggcgtga | tgtagaacat | atfttaacttc | tattctcatg | 3240 |
| 60 | gtagtcaaaa | attattttatt | tattftctaaa | ataatftftft | aataatfttct | tgaaatgtgg | 3300 |
| | gggttgaaat | ataggggtta | gggtfttcatg | tgattatgag | tataatacat | catataatag | 3360 |
| 65 | gggagttaga | caagcatatt | tgggtcacgt | cacatacgaa | ttftftcagtt | ttgagctaac | 3420 |

ES 2 341 527 B1

aatattttgt catatttttt tttctcgacg gttcaaaaat atcaaatttt cctggggttt 3480
 ccaacaagcc aaactttcaa cgaattttgt caaaaaaatt caattggaaa tgtacacttt 3540
 5 atgcaattat gatatagtgt caccgaaatt aaaattaaaa ttcttttaggt atttgatatt 3600
 tcctccttac ttacatatct cttgggttct agctcaacct tgtcaacttt gacattgaat 3660
 ctaatgctta ttacctaate tagttctata agagtttgat tttttatatg gtcattaaac 3720
 10 taataattgt tatcttaaaa atcacctctc ttttttattt tgagatactt cttccatttc 3780
 aatttgtttg tcttattaaa acttgttacg gagtttaaga aagtaaaaaa gaataattta 3840
 15 aatcttgtaa ttttaatta cagatatgtc aaatgtacca aaagtagatt tttactttaa 3900
 cctactaaga aaagataact gttattttcc tatttatcct caatattagt tcctaactat 3960
 tcttcaaaat tgtttcttaa aattaaagac tatacatcaa ttaatatgat atgagtacta 4020
 20 tgaaaatgta ttcatattaa ttattgtttt tccagaggca tacaaaatat aaaataaata 4080
 aaaataatta tattaataat taattaagtg attatatgag aaattaagtg gtagcagtaa 4140
 agagttacat ttatgaagac ctagtcaaac taaaagctta ttaattaatt tttggtatcc 4200
 25 tttttttca ccatttcttg gtgaatttta gtagagaggg agtacggaaa aaaaagagtc 4260
 actgcacttt cctttcttac atagggaga atgacttttg actgtctgca attttttcgt 4320
 30 cgaaaattat atcgtataaa taaattagta cataagttgt tgaatctctt ttaattttag 4380
 tgttaaagaa tgttttaagt tatgaatttt gaattataga ataataaac atttcattga 4440
 gtagagaata gattttatgt atatatgcta atgtgaattt cttcaacata aatacatgat 4500
 35 ttaggcta at gctatcaaac acctaattga tattgtagat tcctaccttt aggagttag 4560
 ggggtgggta gattttaagg ttattatatt ttttttaaaa aattcatata taaatttctg 4620
 40 attccgtcat tattgaggtg gatttagggc ataagcaaag acctagtcaa actaaaagct 4680
 tattaattaa ttttggtatc ctatttttca ccatttcttg tgaattttag tagagagggga 4740
 gtacggaaaa aaaaagagtc actgcacttt cctttcttac atagggaga atgacttttg 4800
 45 actgtctgca attttttcgt cgaaaattat atcgtataaa taaattagta cataagttgt 4860
 tgaatctctt ttaattttag tgttaaagaa tgttttaagt tatgaatttt gaattataga 4920
 ataataaac atttcattga gtagagaata gattttatgt atatatgcta atgtgaattt 4980
 50 cttcaacata aatacatgat ttaggcta at gctatcaaac acctaattga tattgtagat 5040
 tcctaccttt aggagttag ggggtgggta gattttaggt attatatttt tttaaaaaaa 5100
 55 ttcattggtt atgaaaatcg aatacctctt gtacatatct attaaaaaaa tcattccgaa 5160
 atcataattt gaactcatta ttattattat atatatattt tttttttatc tttacgattt 5220
 attattatat aaatcttctt ttcaattgtc tgttttactt cttttttctt gtttgttctt 5280
 60 aaagaatgtc tcttttctta ttttgacaaa ttttttaact tgaacttttc gttttcatat 5340
 gatatgttta aaatcataag ataaataatt tgtgataaaa taaccgagat cacaaatcaa 5400
 65 aatcagacaa ataaattgta gaatttattt ttgggatggt tgcgggggata aaagggtttt 5460

ES 2 341 527 B1

cgttgggggt attattcaat gggtaaaatt aagaaacatt gtagccaatc atgttgttgg 5520
 atcttgagcc aacgtggcag ggaacaacca atcactagct cgatgaaatt aaggttacat 5580
 5 aatgcttcaa ttcttcttac tgtaagtgc gaaaggatta cttgttcac cttttaaccc 5640
 agaggataaa agaagactca caaatcacat ttgatgcgac attgtttgac ttaacatgat 5700
 gtttaagaaa aaaaaaagat tattctttta aattttgtgg tttaaaaaca ttattttgta 5760
 10 gttataaatt atttttatca agagtgaaag gaattttgaa attgaattat ttctacatag 5820
 tagggacaga ttttaataaga aatgtgccac ataatataga gagtataatc atttaggtag 5880
 15 aaagaattta acttttgatt ttgacttttg agaggaatgt acaaccgtca aaaatactct 5940
 ttgaattttt tagttctaaa agtatggaaa cataacattt ttttaaaaa atattaaaa 6000
 gttttaaaaa atcacttccc ctgactttt tacctagatc aaaatcagtt tcaggctatc 6060
 20 caaacttttt gaaaggttat tacttgtaat tataatagtc tatgttattc ggatttatca 6120
 aaaaaataga cggataagta agattcttta aaagtaaagc atttttagtg attccgacat 6180
 25 agatggggca acatttattt tgtttagggc gtccccatct aaaagattga caagacattt 6240
 tgggtagttt ttttttttc ttttgattaa aaaagttaa tttatttata tgtaatatgc 6300
 atccatacaa gacctgtggc ctgaagcatt acattcaaaa gaaatattta ctaagttata 6360
 30 aacatagttc atacatacta tctgataata aggttaaaaa ttgctcttc ctcgtctgca 6420
 ttgacgattt tcaaaacgaa tacaggattg ctcttgtttg tatcatcatc atcatcaaca 6480
 atttctccgt cttttggatt gcaattccac attctaggtc gaaaatacat agaattgtga 6540
 35 catctgaaaa atgatttgtt ttgtatttgt gtgtatttgc agtgttaggg caactattga 6600
 taggtacaag aaacaccatg ctgattccac tagtactgga tctgtttctg aagctaacac 6660
 40 tcaggtaaac ttgtttatat aaatcattat ttttagatgt aattttttta tatttaatcg 6720
 tccacctagg gttttacctc tcgtgcatca aagcaaaaga ctaaacaaaa atatctttag 6780
 cactatctat atcaaggatt ttttaacctc gcggttagct caagattcga cacataggcc 6840
 45 gtgggctcgt ggcttccctt cttaatgagg atagaggcta aggccgagg ttagtcaaaa 6900
 cagataataa catgaaattt gggggctagg atgttaaaat aggtaataaa gtttgtacct 6960
 ttatgatggg gcaaacctca acaaagacct gtttctaaaa aggaggatgg ggagggaagt 7020
 50 gttacaacct acaaaacaatt actaattggt gaactctatt gttgagacgt cttttcattt 7080
 aaaccttaga caaatcgtg aggtttaaaa gccttaatta aaaacataaa aaatacttaa 7140
 55 ctagttgacc tagaccattc cacttacatt ttgttttagt atcaatcgca cagagaacta 7200
 gatTTTTTct aatcatcaca aaaatgatta aattgactca aacttttata tattcctcag 7260
 tactaccagc aagaagcatc caaactgcga cgacaaattc gagatataca gacttataac 7320
 60 aggtcagtcc aaagtggact tctctaatat aaatcattgt gtactatcag aaaatcacta 7380
 atttttattg aatttttttg ttggaattta acagaatatg gaatgtcgaa aattagagat 7440
 65 tttctagtag tgaccaaaagt tgtagtaatt atgatttttt gatttgttta ggcaaatagt 7500

ES 2 341 527 B1

tggagaggca ttgggcagtt taagccctag agacctcaag aatttggaag ggaaacttga 7560
 aaaggccatt ggtagagtcc gttccaaaaa ggtaaataat tcaacttttt gttagctgat 7620
 5 tttcactgtt ttcttcttat tattacaaag gtaaaaaact gacatttttt tattttatca 7680
 ttttccagaa tgaattgctt ttctcagaaa tagagctcat gcaaaagagg gtaaaactac 7740
 taatttatgt gctttcctta attatatatt tataatcatg atgttcaggt cagtttgcgt 7800
 10 gcacttaaat taattttaca agatatctgc tacctttcac tagcaataaa ttacctagta 7860
 gttttgcctc atctgtattc gaacatgaaa catcatgaac ttaatattca gttttattaa 7920
 15 tcagtaaacc acccccttaa atgcaaaata tagacgacat acttcaatca actttacggt 7980
 tagatgagtc aagataaatt gagctaataa ataaatagat cattaattaa cttatccaaa 8040
 ttttataaat tttattttca tgaactaatc ttatcacttg acaggagatt gagctgcaga 8100
 20 acgccaacat gtatctacgc gcaaaggctc tattattttc tctatgcctt tatgtttacga 8160
 taggactcta ctagtatctg gacgtttgac catgtttacat tgtgaaattt ttttttaaaa 8220
 aaatttttgt ttttaaaatt gaaaatgata tttcaaaatt gaaattgtgt ttgaccatgt 8280
 25 caaattaaag ttgttttcta ctttgtgtga gtgatttggg gtgaatagtc aaaaacacat 8340
 tttcgttggt tttcaaattc ttgaattcaa ctatgacgaa acgtgctttt tcagagttca 8400
 30 actccgaaa aattgaaaat ttttcatgat caaacgcctc cttgatcatt ttaacttgaa 8460
 aattaatcct tgaaatgtac atatgtagca gatagcagag gtagagagag cacaagagca 8520
 aatgaacttg atgcctggag gcgagggcgg aggcggaggc ggaggaggag gaggatctga 8580
 35 tcatcaatac catcatcagc caaattacga agatgctcgc aataacttcc tgcctgtaaa 8640
 tctcctggaa ccaaactctc attactctcg tcgcgacaat ggtgaccaa ctcctctcca 8700
 40 gcttgtgtat gcctctcttc cttcttaatt ataattttgt aattttattag ttgactcac 8760
 atgagtgata aattttacta aaaacttatt aaggttttta gtatggattg agattttata 8820
 ccatgaaaca aaaacttgct atggaagggg aggtgtgaac gtttagctcc cgataataga 8880
 45 gagttgttca gatggtaaat attccttact ttcaattcta aagatgagtt atcaagagag 8940
 caaacgggt ggaagctctc tgaggagggg tagaaaaaa aggaaatttt accttttagt 9000
 acaattagaa tatgaaactc gagaaaaaat aatagttgaa atatgttttt ttttttgact 9060
 50 attttctcta aaacttcaat tagtggagtc tttgttatat caaagctggg ataaactaat 9120
 cccataatag ctttgatagt ccaaaaaacc tggaacttca ttttaggttt atagaattgt 9180
 55 ttttgggtgt cttacaaaa ccagggtcaa agctacaact ttgcccacag atttggtaaa 9240
 atctaataat tttggctcaa atcatatatt tgtgttttaa agtttaact aaaatgtatt 9300
 caataatttg ttgaggacc cagtaaacaac agattatgcc tcactaaaaa ttactttatg 9360
 60 tgaagacggg gattcattat gtgcttttaa cctaactcaa gccaaaaaa atattttattc 9420
 aatagtcacc acttgcccac ttttgctccc aaatcttttc tggttgttct tttcaaaaaa 9480
 65 catgggttac atctttttac gacattcatt accaataacc agtttataga tgagtgttct 9540

ES 2 341 527 B1

| | | |
|----|---|-------|
| | tgaagtagtc agtctagatc tgaacctaca tgctaagtag atgacttgct aggcgagcgg | 9600 |
| | agcggaacct aagatttctt gtaaataattt tcagtcaatc cacccattgc cttaatgttt | 9660 |
| 5 | tgtgtccaat gctcaaaact ttcttacttt ttgtcttcat ttatatgtgt tgtaaagaga | 9720 |
| | ttgtcagaat cttaaagaaa gacaagaaac tttgtcaaat ctaagaagaa ctaagtctat | 9780 |
| 10 | ggtcagggga agattaactg atgggagttt gcggaacaca ataacattag cgtgaatttc | 9840 |
| | gtatttgtgt taagaaattc acttaataga cataaataat cttatgtaga acaaagtgat | 9900 |
| | ccaaaattca ttacttttagc tagcgtttgg ctataaattt tggatcaaat ttttaagaaaa | 9960 |
| 15 | ttccactttc actactagaa ataaaagggt tttttccatt gcaaatcaat cgaaaatttg | 10020 |
| | tgttacaaaa tatgatTTTT ccaccaaagc agttcattgt gaaaacacac ggtggagaaa | 10080 |
| | caaattgtca cggaaatatt atgaaacttc ctaacttttc cttgCGAAAA cattactgtt | 10140 |
| 20 | ttttattttc gttcaatcaa aatatatgtg gaaatagcta ctgaaaagtg attcttagta | 10200 |
| | gtgcttaatt acttcaatta tttttaactg attatttctc catttttgtc ttggctggtt | 10260 |
| 25 | ttatttatgc agcctgataa tcatggagca ggtattctga aatttgggggt caaggctctt | 10320 |
| | catcttcaga aaaatgtgta ctacaatttt taacctatag tgttgtaaata cataatcata | 10380 |
| | attattgccA ctgagattta aactgttt | 10408 |
| 30 | | |
| 35 | | |
| 40 | | |
| 45 | | |
| 50 | | |
| 55 | | |
| 60 | | |
| 65 | | |



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 341 527

② Nº de solicitud: 200900003

③ Fecha de presentación de la solicitud: 18.12.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 15/82** (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A | ISHIDA B.K. et al., "Induction of AGAMOUS gene expression plays a key role in ripening of tomato sepals in vitro" Plant Molecular Biology (1998), vol. 36, pág. 733-73. Todo el documento. | 1-15 |
| A | US 6229068 B1 (YANOFSKY et al.) 08.05.2001, todo el documento. | 1-15 |
| A | PNUELI L. et al., "Isolation of the tomato gene TAG1 and analysis of its homeotic role in transgenic plants." Plant Cell (1994), vol. 6, pág. 163-173. Todo el documento. | 1-15 |
| A | BUSI M.V. et al., "MAD-box genes expressed during tomato seed and fruit development." Plant Molecular Biology, (2003), 52(4):801-815. Todo el documento. | 1-15 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.03.2010

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC,WPI,MEDLINE,EMBASE,BIOSIS,EBI SEQUENCES DATABASES

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.03.2010

Declaración

| | | |
|--|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-15 | SÍ |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-15 | SÍ |
| | Reivindicaciones | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01 | ISHIDA B.K. ET AL., "Induction of AGAMOUS gene expression plays a key role in ripening of tomato sepals in vitro" Plant Molecular Biology (1998), vol. 36, pág. 733-73 | - - |
| D02 | US 6229068 B1 | 08-05-2001 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención de la presente solicitud se refiere a una secuencia de nucleótidos capaz de incrementar la expresión de un gen de desarrollo reproductivo, preferiblemente TAGL1. Esta secuencia tiene como parte principal una secuencia truncada del regulador constitutivo de la expresión génica 35S en una orientación invertida que se une por su extremo 3' a una secuencia reguladora de la expresión génica que a su vez se une por su extremo 3' al gen de desarrollo reproductivo. En el mutante de inserción (ALK) obtenido con el uso de dicha construcción el cáliz de la flor se convierte en fruto, los niveles de azúcares y el contenido en grados Brix aumentan. Estos mutantes también presentan una mayor tasa de cuajado del fruto y tienen inhibida la zona de abscisión del fruto.

En el documento D01 se examina la expresión del gen TAG1 de tomate durante la maduración, sobre cultivos in vitro de sépalos y otros tejidos. De acuerdo con este documento la inducción de una expresión elevada del gen TAG1 de tomate resulta crucial en la maduración de cultivos in vitro de sépalos de tomate. En este documento también se describe un tomate transgénico en el que los sépalos se han convertido en fruto. Según un experimento desarrollado por los autores los sépalos de fruta de plantas de tomate transgénico que expresaban el gen TAG1 ectópicamente fueron inducidos in vivo a bajas temperaturas para provocar su maduración y se observó en ellos la producción de licopeno y el ablandamiento de las paredes celulares característico del tejido pericárpico.

El documento D02 describe el uso del gen Agamous-like 8 (AGL8) para producir semillas transgénicas. Con el uso de este gen exógeno se puede aumentar o disminuir el tamaño de las semillas y los frutos. Tal y como se describe en los Ejemplos I y II la expresión del gen AGL8 está controlada por el promotor 35S de CaMV. Este promotor es un elemento regulador constitutivo bien caracterizado y utilizado en la expresión ectópica de genes. Concretamente en el Ejemplo II se utiliza una duplicación en tandem de dicho promotor que altera el desarrollo normal de la planta y produce frutos un 50% más grandes que los de la planta salvaje.

A la vista de la información aportada en ambos documentos esta Oficina considera que en el estado de la técnica relativo a la invención no hay elementos suficientes que sugieran que la secuencia de la invención pueda dar lugar a los mutantes de inserción con las características antes descritas. En este sentido esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-15 son nuevas y tienen actividad inventiva.