

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 364 932**

21 Número de solicitud: 200902130

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

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **07.11.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
19.09.2011

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28020 Madrid, ES
Universidad Politécnica de Valencia

72 Inventor/es: **Granell Richart, Antonio;**
Rambla Nebot, José Luis;
Marti Ibáñez, Cristina;
Bendahmane, Abdel y
Piron, Florence

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Alteración en la expresión de la proteína DELLA u ortóloga para alterar el patrón de crecimiento de las plantas y el contenido de metabolitos del fruto.**

57 Resumen:

Alteración en la expresión de la proteína DELLA u ortóloga para alterar el patrón de crecimiento de las plantas y el contenido de metabolitos del fruto. La presente invención describe nuevas funciones del gen SIDELLA de *Solanum lycopersicum* así como sus usos y versiones mutantes del gen asociadas a nuevos fenotipos que suponen la modificación del hábito de crecimiento y del metabolismo de las plantas portadoras de esas alteraciones así como cierta influencia en el contenido de metabolitos del fruto del tomate.

ES 2 364 932 A1

DESCRIPCIÓN

Alteración en la expresión de la proteína DELLA u ortóloga para alterar el patrón de crecimiento de las plantas y el contenido de metabolitos del fruto.

5

Sector técnico de la invención

La presente invención describe nuevas funciones del gen SIDECLA de *Solanum lycopersicum* así como sus usos y versiones mutantes del gen asociadas a nuevos fenotipos que suponen la modificación del hábito de crecimiento y del metabolismo de las plantas portadoras de esas alteraciones que resulta en una alteración en el contenido de metabolitos del fruto del tomate.

10

Antecedentes de la invención

15

En general la arquitectura final de una planta depende del número, tamaño y porte de los elementos constituyentes (hojas, entrenudos, flores y frutos) y de la forma en la que se insertan en el cuerpo general de la planta. Incluso más importante que lo anterior es el hábito de crecimiento.

20

La productividad de una planta resulta afectada por factores genéticos, fisiológicos y medioambientales, pero la propia arquitectura y hábito de crecimiento son determinantes clave.

25

La planta del tomate (*Solanum lycopersicum*) es de la familia de las solanáceas (Solanaceae) originaria de América y cultivada en todo el mundo por su fruto comestible, el cual es una baya coloreada de tonos que van del amarillento al rojo, debido a la presencia de los pigmentos licopeno y caroteno. Posee un sabor ligeramente ácido y se produce y consume en todo el mundo tanto fresco como procesado de diferentes modos.

30

Por el hábito de crecimiento, que va a estar dado por el tipo de ramificaciones de las plantas, se reconocen dos grandes grupos de variedades, las de crecimiento indeterminado y las de crecimiento determinado. El primer grupo se caracteriza por tener un ápice vegetativo con dominancia, que le confiere crecimiento continuo al tallo o eje principal. Se reconocen fácilmente ya que presentan un racimo floral cada tres hojas y un crecimiento radial amplio. En las variedades de crecimiento determinado los brotes siempre terminan en una inflorescencia, por lo tanto siempre se debe dejar el brote axilar superior para conducirla como indeterminada. Este grupo de variedades, las cuales también se denominan "arbusivas", no requieren soporte durante su crecimiento. Las variedades arbusivas enanas son un subgrupo dentro de las variedades determinadas caracterizadas por su menor tamaño y por producir frutos del tipo "cereza" o "cherry".

35

El cuidar el sabor del tomate no es tarea fácil. La intensidad de las propiedades del sabor del fruto de tomate está determinado por la cantidad de azúcar (fructosa y glucosa principalmente), por el contenido de ácidos orgánicos (cítrico y málico principalmente) y la composición de los compuestos volátiles. La diferencia de sabores entre variedades se explican por la diferencia de las proporciones cuantitativas de las sustancias volátiles, muchas de las cuales se desarrollan durante la maduración.

40

La solicitud de patente ES 2235335 T3 describe un procedimiento de manipulación del aroma de productos del tomate, que consiste en incubar trozos de tomate con una enzima con actividad alcohol deshidrogenasa y un cofactor de alcohol deshidrogenasa; así como los productos obtenidos por este procedimiento.

45

Las plantas de crecimiento simpodial tienen un tipo de crecimiento lateral peculiar en el que el meristemo apical termina (aborta o se diferencia en una flor/meristemo inflorescente) pero la planta continúa creciendo a partir del meristemo axilar normalmente localizado por debajo de la hoja superior, lo que se repite después de unos cuantos nodos foliares, provocando un crecimiento apical continuado.

50

Las plantas de tomate exhiben un patrón de crecimiento simpodial caracterizado por la alternancia en los brotes de órganos vegetativos y reproductivos. Este patrón se establece después de un periodo inicial en el que solo se producen órganos vegetativos (tallos/entrenudos y hojas en la parte aérea) que en el caso del tomate supone la producción de unos 5 a 20 nodos foliares que acaba con la formación, en el meristemo apical del brote principal, de un meristemo inflorescente que supone la terminación de dicho simpodio principal. El crecimiento de la planta no se detiene ahí, sino que continúa a partir de la yema axilar situada en la axila de la hoja más próxima a esa nueva inflorescencia. En todas las especies de tomate silvestres y la mayor parte de las de consumo en fresco el hábito de crecimiento que continúa a partir de aquí es la producción de simpodios cada uno consistente en unas 2 o 3 hojas y una inflorescencia en el que el nuevo simpodio se vuelve a producir a partir de la axila de la última hoja por debajo de la nueva inflorescencia. Ello produce una planta de gran crecimiento que produce continuamente frutos a lo largo del eje principal, con frutos de diferente estadio de maduración en cualquier momento del crecimiento post floración. Este hábito de crecimiento se denomina en este caso "indeterminado".

55

Por el contrario las plantas de tomate que llevan en homocigosis la mutación recesiva *self-pruning sp (sp/sp)* solo producen dos o tres brotes simpodiales después de la primera inflorescencia consistentes cada uno en 2 ó 3 hojas y una inflorescencia, tras lo cual producen 2 inflorescencias seguidas y cesa así el crecimiento. Esta mutación confiere un

60

65

hábito de crecimiento “determinado” que además de afectar el porte de la planta resulta en un cuajado y maduración de frutos más concentrada en el tiempo de lo que ocurre en las plantas de crecimiento indeterminado (Stevens y Rick, 1986; Yeager, 1927).

5 El locus *self-pruning* (*SP*) ha sido clonado (Pnueli *et al.*, 1998) y demostrado ser un ortólogo de los genes *Centro-radialis* (*CEN*) de *Antirrhinum* y *Terminal Flower* (*TFL1*) de *Arabidopsis*. La familia de genes denominada a partir de estos tres “*CETS*” (de *CEN*, *TFL1* y *SP*), están conservados entre diferentes especies vegetales donde afectan la floración y la determinación/indeterminación (Pnueli *et al.*, 2001, Foucher *et al.*, 2003).

10 En el caso del tomate, *SP* pertenece a una pequeña familia génica de seis miembros (*SP*, *SP2I*, *SP3D*, *SP5G*, *SP6A*, and *SP9D*) distribuidos en cinco cromosomas (Carmel-Goren *et al.*, 2003), si bien el causante de la mutación *sp* que esta en el cromosoma seis es el único demostrado que puede controlar el paso entre hábito de crecimiento determinado e indeterminado. Los otros parálogos de *SP* en tomate no están muy caracterizados pero parecen afectar la expresión del fenotipo determinado modificando el momento en el que se determina la planta (caso de introgre-
15 siones de *SP9D* y de *SP5G* de *pennelli* en M82 (Carmel-Goren *et al.*, 2003; Eshed and Zamir, 1995; Jones *et al.*, 2007).

La mutación *self-pruning* ha sido introducida en la mayor parte de las variedades de tomate de industria, ya que favorece la recolección mecánica (Hanna *et al.*, 1966; Friedland y Barton, 1975; Stevens y Rick, 1986; Yeager, 1927)
20 y no se dispone de métodos alternativos o que modulen la expresión de *SP*.

Por otra parte, las proteínas DELLA se han descrito como elementos clave que integrarían tanto señales externas como las mediadas por fitohormonas, adaptando el crecimiento de las plantas a las necesidades y condiciones medioambientales.

25 Las proteínas DELLA son miembros de una subfamilia GRAS de reguladores que parecen actuar a nivel nuclear como represores de procesos de desarrollo y crecimiento. Según el modelo actual, elaborado fundamentalmente a partir del trabajo realizado en *Arabidopsis* y arroz, el bloqueo en el crecimiento ejercido por las proteínas DELLA (una familia de cinco miembros en *Arabidopsis*, pero uno solo en el arroz) y en la mayor parte de los cultivos, incluido
30 el tomate, sería eliminado por degradación dirigida de la proteína DELLA (Dill *et al.*, 2001; Dill y Sun, 2001; Lee *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 1997; Richards *et al.*, 2001; Wen y Chang, 2002). El mecanismo de acción subyacente al efecto de inducción del crecimiento de las fitohormonas giberelinas (GA) estaría basado en que tras la unión de la GA al receptor *GID* se produciría un cambio conformacional de la proteína que favorecería su interacción con DELLA y aumentaría su afinidad a ser degradada por el proteosoma 26S. (Murase *et al.*, 2007; Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2007;
35 2008).

Por lo que respecta al crecimiento y programas de desarrollo, parece ser que la ruta DELLA integra la transición floral en respuesta a la luz, al etileno y a las auxinas entre otras y actuarían afectando la estabilidad de las proteínas DELLA, su transcripción o de forma indirecta afectando los niveles de GAs (Achard *et al.*, 2006; Achard *et al.*, 2003;
40 Fu y Harberd, 2003; Oh *et al.*, 2007).

Existen mutantes en dos genes *DELLA* de *Arabidopsis* (*gai* y *rga*) que están alterados en la estatura de la planta, fundamentalmente debido a la longitud de los entrenudos y al tiempo de floración (Koorneer *et al.*, 1985; Peng y Harberd, 1999, 1993; Peng *et al.*, 1997; Silverstone *et al.*, 1998; Wilson y Somerville, 1995). La modulación de los
45 niveles del único gen *DELLA* en tomate, *SIDELLA*, provoca alteraciones en las estructuras reproductivas y en el porte de la planta (Marti *et al.* 2007). Todas las alteraciones descritas en el porte de la planta tienen que ver con la longitud de los entrenudos y con el tiempo de floración en plantas monopodiales (crecen produciendo tejido vegetativo hasta producir la flor terminal y detienen ahí su crecimiento).

50 Sería necesario y deseable disponer de otros mecanismos de control del hábito de crecimiento de las plantas de cultivo, por ejemplo en tomate, alternativos a *self-pruning* o que modularan la actividad de *self-pruning* produciendo plantas con diferente grado de determinación, y en consecuencia con diferente porte y número de flores y frutos.

55 Objeto de la invención

La presente invención proporciona plantas genéticamente modificadas con la expresión de las proteínas DELLA u ortóloga alterada produciendo así una inhibición en la represión del desarrollo y crecimiento de las plantas en comparación a plantas correspondientes no modificadas genéticamente. Debido a la alteración en la expresión de
60 DELLA, mediante silenciamiento o mutación, las plantas genéticamente modificadas verán alterado su patrón de crecimiento simpodial y/o el contenido de metabolitos y/o sustancias volátiles en el fruto. La presente invención también se refiere a los frutos y semillas de las plantas modificadas genéticamente así como al procedimiento empleado para obtener dichas plantas.

65 La expresión de DELLA se regula mediante el gen *SIDELLA* descrito y ha sido utilizado por los autores de la presente solicitud (Marti *et al.* 2007), sin embargo la regulación de su expresión para alterar el patrón de crecimiento y/o para alterar el contenido de los metabolitos de los frutos son funciones nuevas, así como sus aplicaciones.

ES 2 364 932 A1

Se conoce un gen ortólogo (semejante por pertenecer a dos especies que tienen un antepasado común) del gen *SIDELLA*, más concretamente es el gen *GAI* de *Arabidopsis* en tomate (*Solanum lycopersicum*). En US 6,307,126 y su continuación US 6,830,930, se describe que el gen *GAI* se ha clonado y mutado y la expresión de tales genes en plantas afecta al crecimiento de las mismas, concretamente logrando unas plantas enanas que son útiles para la reducción de las pérdidas que tienen lugar durante el almacenamiento de la cosecha.

Los autores de la presente solicitud han observado que el gen *SIDELLA* en tomate es importante para determinar el número de repeticiones simpodiales, y por lo tanto el porte y número de flores/frutos en el eje principal. Esto debería afectar a la productividad total (número y tamaño de frutos producidos). Por otro lado, modificaciones en este gen afectan al contenido metabólico de los frutos como se ejemplifica para el contenido de compuestos volátiles asociados al aroma del fruto.

De acuerdo con lo descrito en el estado de la técnica, sería simplemente esperable que las modificaciones en *SIDELLA* o genes ortólogos afectaran la altura de la planta y la distancia de los entrenudos, sin afectar al número de estos a excepción del que se produce por una modificación en el tiempo de floración. Las funciones descritas para el gen *GAI* tienen que ver con el crecimiento y el tiempo de floración y está apoyado por los fenotipos observados en *Arabidopsis* y en cereales. Muchas plantas como tomate son de "día neutro" y florecen con independencia de la duración del día.

Una nueva función descrita aquí tiene relevancia en las plantas cuyo crecimiento del eje principal se detiene con la primera flor para seguir creciendo a partir del brote axilar (denominado simpodial) por debajo de la nueva flor. La nueva función se ha puesto de manifiesto por los autores de la presente solicitud en estudios con el gen *SIDELLA*. En plantas de tomate afectadas en los niveles de expresión del gen *SIDELLA* se observa el fenotipo esperable de crecimiento que se ve reflejado en la longitud de los entrenudos. Lo importante de la presente invención es que plantas de tomate que llevan la mutación *sp* y por tanto tienen un crecimiento determinado, es decir el crecimiento del eje principal se detiene después de un número pequeño de 2 ó 3 repeticiones simpodiales (metámero consistente por ejemplo en 2 hojas y una inflorescencia) tras la primera flor, incrementan el número de simpodios o incluso se vuelven indeterminados cuando se bloquea con diferente eficiencia la expresión de *SIDELLA* en plantas transgénicas. Esto ocurre sin modificar significativamente el tiempo de floración y sugiere una forma alternativa a *sp* de alterar el hábito de crecimiento del tomate y por extensión de otras plantas de crecimiento similar (i.e. simpodial).

Hasta el momento la única forma de alterar el hábito de crecimiento en tomate ha sido mediante el gen *self-pruning*. La introducción de ese gen para alterar el patrón de crecimiento del tomate de indeterminado a determinado significó una revolución en el cultivo de tomate de industria y permitió la mecanización de la recolección. Actualmente esta mutación recesiva del gen *self-pruning* ha sido introducida en la mayor parte de las variedades de tomate de industria que son por tanto *sp/sp*. Aparte de unas pocas formas alélicas de genes de la familia *self-pruning* no se ha propuesto ni se dispone de ningún método para alterar el patrón de crecimiento.

En la presente invención se modifica la arquitectura de la planta y el hábito de crecimiento actuando al nivel de *DELLA* (o a nivel de proteínas ortólogas) i.e. mediante transgénesis alterando el nivel de *SIDELLA* (o gen ortólogo) o mediante introducción de mutaciones en el gen *SIDELLA* (o gen ortólogo) que alteran el patrón de crecimiento.

También es objeto de la presente invención la producción e identificación de versiones mutantes en ese gen (o gen ortólogo) que proporcionan diversas intensidades del fenotipo de interés.

Los resultados de la presente solicitud han sido obtenidos utilizando el tomate (*Solanum lycopersicum*) como ejemplo, pero pueden ser de utilidad para otras plantas de crecimiento simpodial determinado o no.

También se describe un método para asociar el carácter con las mutaciones abriendo así la posibilidad de identificar nuevos mutantes en el gen que den versiones diferentes del fenotipo que puedan adaptarse a lo que el productor necesite.

El carácter conferido por el silenciamiento y las mutaciones es de interés comercial y/o agronómico. Puede ser de muy importante para aquellos interesados en alterar el número de brotes simpodiales en plantas con ese tipo de crecimiento, incluyendo pero no limitando a solanáceas, cucurbitáceas como el melón, leñosas, árboles, y obviamente ornamentales como orquidáceas, entre otras plantas de interés.

Es de interés disponer de mecanismos para conferir el hábito de crecimiento que convenga a un determinado tipo de planta, de cultivo u ornamental. Así, puede interesar conferir el carácter determinado a una especie de crecimiento indeterminado, con el propósito de limitar su crecimiento (razones estéticas, disponibilidad de espacio, etc.), o de concentrar como consecuencia de ello la producción y maduración de los frutos en el tiempo.

Por otra parte, interesa incrementar el número de brotes simpodiales de una planta de crecimiento determinado, con objeto de aumentar la producción y la exposición solar de los frutos, incluso de volverla indeterminada.

ES 2 364 932 A1

El disponer de formas de modificar el contenido metabólico de los frutos es importante también desde el punto de vista organoléptico y nutricional. Así, en otro aspecto de la presente invención, se describe como segunda nueva función del gen SIDEELLA u ortólogo la regulación del contenido de los metabolitos y/o sustancias volátiles asociadas al aroma de los frutos que puede ser empleada en todo tipo de plantas, de crecimiento simpodial o no.

El primer objeto de invención se refiere a plantas genéticamente modificadas con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga caracterizadas porque la alteración en la expresión de la proteína DELLA u ortóloga produce una inhibición en la represión del desarrollo y crecimiento de las plantas en comparación a plantas correspondientes no modificadas genéticamente. La alteración en la expresión de DELLA del objeto de invención se obtiene mediante silenciamiento del gen SIDEELLA u ortólogo o mediante mutación del gen SIDEELLA u ortólogo.

En una realización particular, el silenciamiento del gen SIDEELLA u ortólogo se obtiene mediante el empleo una construcción génica que se basa en una copia antisentido del gen SIDEELLA u ortólogo controlada por el promotor 2XCaMV35S.

En otra realización particular, la mutación en la secuencia genética de SIDEELLA se debe a adición y/o inserción y/o supresión y/o sustitución de uno o más nucleótidos de gen SIDEELLA u ortólogo, concretamente, la mutación consiste en la sustitución del nucleótido guanina por adenina en el nucleótido 458, denominada mutación TILLING 1 (SEQ ID No.3) o la sustitución del nucleótido guanina por adenina en el nucleótido 1498, denominada mutación TILLING 2 (SEQ ID No.5) o la sustitución del nucleótido citosina por timina en el nucleótido 994, denominada mutación TILLING 3 (SEQ ID No.7) o la sustitución del nucleótido citosina por timina en el nucleótido 661, denominada mutación TILLING 4 (SEQ ID No.9).

En otra realización particular las plantas genéticamente modificadas del presente objeto de invención, exhiben un patrón de crecimiento simpodial, concretamente un patrón de crecimiento simpodial determinado que se modifica a indeterminado o a semideterminado.

En otra realización particular, las plantas genéticamente modificadas con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga del presente objeto de invención están caracterizadas porque el contenido de metabolitos y/o sustancias volátiles asociadas al aroma de los frutos se ve aumentado y/o disminuido respecto a plantas correspondientes no modificadas genéticamente. Concretamente el aumento en el contenido de los metabolitos se refiere en una realización particular al aumento de sacarosa, tirosina, asparagina, isoleucina, treonina, prolina, ácido piroglutámico y mio-inositol de un orden del 100-400%, y/o el de fructosa y glucosa en un orden del 10-30%, y/o el de las sustancias volátiles asociadas al aroma de los frutos E-2-hexenal, 1-penten-3-ona y β .damascenona de un orden del 100-200%, y/o el de las sustancias volátiles no asociadas al aroma de los frutos ácido 3-metilbutanoico, E,E-2,4-decadienal y E-2-octenal en un orden del 100-200% respecto de plantas correspondientes no modificadas genéticamente. En otra realización particular la disminución en el contenido de las sustancias volátiles asociadas al aroma de los frutos se refiere a una disminución en 3-metilbutanol, 1-nitro-2-feniletano, 2-feniletanol, fenilacetaldehído y 2-isobutiltiazol en un orden del 80-90%, y/o la de las sustancias volátiles no asociadas al aroma de los frutos geranilacetona, terpineol, linalool, bencil alcohol, eugenol, benzilnitrilo, 2-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol en un orden del 50-100% respecto de plantas correspondientes no modificadas genéticamente.

Las plantas genéticamente modificadas del presente objeto de invención son plantas con un interés comercial y/o agrícola y se seleccionan del grupo de las solanaceas, cucurbitáceas, orquidáceas, leñosas, entre otras plantas de interés. En una realización particular las plantas de la invención pertenecen a la familia de las *Solanaceas*, siendo concretamente una planta de tomate *Solanum lycopersicum*.

Un segundo objeto de invención se refiere a los frutos obtenidos de las plantas genéticamente modificadas según el anterior objeto de invención con un contenido de ciertos metabolitos y/o sustancias volátiles asociadas al aroma aumentado y/o el contenido de otros metabolitos y/o sustancias volátiles asociadas al aroma disminuido respecto a los frutos de plantas correspondientes no modificadas genéticamente. El aumento en el contenido de los metabolitos se refiere en una realización particular al aumento de sacarosa, tirosina, asparagina, isoleucina, treonina, prolina, ácido piroglutámico y mio-inositol de un orden del 100-400%, y/o el de fructosa y glucosa en un orden del 10-30%, y/o el de las sustancias volátiles asociadas al aroma de los frutos E-2-hexenal, 1-penten-3-ona y β .damascenona de un orden del 100-200%, y/o el de las sustancias volátiles no asociadas al aroma de los frutos ácido 3-metilbutanoico, E,E-2,4-decadienal y E-2-octenal en un orden del 100-200% respecto de plantas correspondientes no modificadas genéticamente. En otra realización particular la disminución en el contenido de las sustancias volátiles asociadas al aroma de los frutos se refiere a una disminución en 3-metilbutanol, 1-nitro-2-feniletano, 2-feniletanol, fenilacetaldehído y 2-isobutiltiazol en un orden del 80-90%, y/o la de las sustancias volátiles no asociadas al aroma de los frutos geranilacetona, terpineol, linalool, bencil alcohol, eugenol, benzilnitrilo, 2-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol en un orden del 50-100% respecto de plantas correspondientes no modificadas genéticamente.

Otro objeto de invención se refiere a las semillas de las plantas genéticamente modificadas según el primer objeto de invención, en las que la expresión de las proteínas DELLA u ortóloga se encuentra alterada.

ES 2 364 932 A1

Otro objeto de invención se refiere al procedimiento de obtención de plantas genéticamente modificadas con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga que comprende las siguientes etapas:

- a) transformar el genoma de una célula de la planta,
- b) regenerar la planta a partir de la célula de la etapa a),
- c) obtener semillas de la planta transformada que contengan el genoma modificado y,
- d) crecer al menos una de las semillas de la etapa c) para obtener una planta que contenga la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga.

En una realización particular la etapa a) del presente objeto de invención consiste en una mutagénesis dirigida cuya realización se obtiene mediante el silenciamiento del gen *SIDELLA* empleando la construcción génica *asDELLA* que se basa en una copia antisentido del gen *SIDELLA* controlada por el promotor 2XCaMV35S. En otra realización particular la etapa a) del presente objeto de invención consiste en una mutagénesis dirigida cuya realización consiste en modificar la secuencia nativa del gen *SIDELLA* a la secuencia del gen *SIDELLA* mutado seleccionado del grupo de las mutaciones denominadas TILLING 1 (SEQ ID No 3), TILLING 2 (SEQ ID No 5), TILLING 3 (SEQ ID No 7) y/o TILLING 4 (SEQ ID No 9).

En otra realización particular, del presente objeto de invención, la etapa b) es opcional y en otra realización dicha transformación es mediada por *Agrobacterium*.

En otra realización particular la etapa a) consiste en una mutagénesis no dirigida que comprende las siguientes etapas:

- i. exponer la planta a un agente mutagénico, preferentemente el tilmetanosulfonato
- ii. extraer el DNA de cada una de las familias y combinar siguiendo una estrategia 3D,
- iii. rastrear el gen *SIDELLA* en cada familia mediante PCR anidada y cebadores universales,
- iv. detectar los alelos mutantes de *SIDELLA* por secuenciación y deconvolución.

A partir de la etapa (iv) de la presente realización se seleccionaron 4 formas alélicas de *SIDELLA*, concretamente las denominadas: TILLING 1 (SEQ ID No 3), TILLING 2 (SEQ ID No 5), TILLING 3 (SEQ ID No 7), TILLING 4 (SEQ ID No 9).

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Estructura de la construcción génica introducida en tomate para disminuir los niveles de *SIDELLA* en plantas transgénicas. Esquema de la estructura del T-DNA: **2x35S**: promotor 35SCaMV (virus del mosaico del tabaco) duplicado. **CaMV poli (A)⁺**: secuencia de poliadenilación del CaMV. **NptII**: gen que confiere resistencia a la kanamicina, con el promotor y el terminador de la nopalina sintetasa (pnos y tnos).

Figura 2: Efecto de la estrategia sobre los niveles de *SIDELLA* en las plantas transgénicas *asDELLA*. Análisis de los niveles de expresión de *asSIDELLA* y *SIDELLA* en entrenudos de plantas transgénicas y silvestres mediante RT-PCR semicuantitativa. En la figura se confirma la expresión de *asSIDELLA* en las líneas transgénicas (líneas 5A, 24B y 7C). Al mismo tiempo se comprueba la disminución de los niveles endógenos de *SIDELLA* en estas mismas líneas en comparación con una planta silvestre (wt). Como control de carga se utilizó la reacción de RT-PCR para la actina.

Figura 3: Efecto de la estrategia sobre el crecimiento y la producción de brotes simpodiales en las plantas transgénicas *asDELLA*. (A) Efecto sobre la altura total de las plantas medida después de 90 días. (B) Efecto sobre el crecimiento, número de entrenudos y tamaño de los mismos a lo largo de 120 días. En estas gráficas se observa la mayor altura alcanzada por las plantas transgénicas en comparación con las silvestres, así como que esta mayor altura se debe tanto a un aumento en el número de entrenudos como en su longitud. En las plantas transgénicas el crecimiento del brote simpodial se detiene más tarde o incluso adquiere crecimiento indeterminado. Los valores corresponden a la media de 4 plantas. La barra indica el error estándar, **wt**: planta silvestre. **5A, 24B, 7C**: líneas transgénicas *asDELLA* independientes. **EN**: entrenudo

Figuras 4-7: (A) Secuencias nucleotídica y (B) estructura primaria de las proteínas correspondientes a las formas mutadas de *SIDELLA* identificadas por TILLING: Mutante TILLING 1 (figura 4), Mutante TILLING 2 (figura 5), Mutante TILLING 3 (figura 6) y Mutante TILLING 4 (figura 7), donde se marcan en negrita y subrayadas los nucleótidos y aminoácidos mutados respecto a la secuencia de *SIDELLA* cultivar determinado M82.

Figura 4 En el mutante TILLING 1 (A) a nivel nucleotídico existe una sustitución de guanina por adenina (en el nucleótido 458) y (B) a nivel aminoácido existe una sustitución de alanina por treonina (en el aminoácido 153).

Figura 5 En el mutante TILLING 2 (A) a nivel nucleotídico existe una sustitución de guanina por adenina (en el nucleótido 1498) y (B) a nivel aminoácido existe una sustitución de glutamina por lisina (en el aminoácido 500).
 Figura 6 En el mutante TILLING 3 (A) a nivel nucleotídico existe una sustitución de citosina por timina (en el nucleótido 994) y (B) a nivel aminoácido existe una sustitución de leucina por fenilalanina (en el aminoácido 332).
 5 Figura 7 En el mutante TILLING 4 (A) a nivel nucleotídico existe una sustitución de citosina por timina (en el nucleótido 661) y (B) a nivel aminoácido existe una sustitución de leucina por fenilalanina (en el aminoácido 221).

Figuras 8-11: Apilamiento de los diferentes mutantes de TILLING caracterizados y localización de la mutación en la estructura primaria de la proteína comparada con otras proteínas DELLA de otras plantas para ver el grado de conservación del aminoácido afectado. Salvo en el mutante TILLING 1, todas las mutaciones se producen en regiones muy conservadas de la proteína. (SIDE~~L~~LA de *Solanum lycopersicum* del cultivar determinado M82; StGAI de *Solanum tuberosum*; GhGAI de *Gosipium hirsutum*; AtGAI, AtRGA, AtRGL1; AtRGL2 y AtRGL de *Arabidopsis thaliana*; VvGAI de *Vitis vinifera*; ZmGAI de *Zea mais*; OsGAI de *Oryza sativa* y TaGAI de *Triticum aestivum*) El alineamiento se realizó con el algoritmo "ClustalW" del EBI (www2.ebi.ac.uk/clustalw/). Las secuencias de las proteínas DELLA empleadas para la realización de estos apilamientos pueden ser consultada en bases de datos públicas como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

Figura 12: Fenotipo de planta silvestre M82 frente al de las plantas de TILLING con mutación puntual en homocigosis o heterocigosis en SIDE~~L~~LA. Se observa un aumento en la altura de las plantas mutantes, que presentan mayor biomasa y mayor número de frutos.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención el término "*índice simpodial*" (sympodial index) es el número de nodos (hojas) sobre el brote principal hasta la inflorescencia.

El "*hábito de crecimiento*" (plant habit), también denominado patrón de crecimiento, según la presente invención es aquél presentado por las plantas debido a la composición, el patrón de ramificación, el desarrollo y la textura así como la disposición en el espacio temporal de las unidades modulares consistentes en hojas, entrenudos y flores (frutos).

El "*crecimiento simpodial*" es el que presentan plantas como el tomate, melón, muchas cucurbitáceas, legumbres y orquídeas, etc, y que está caracterizado porque el crecimiento del eje principal de la planta se detiene con la formación de la primera inflorescencia, para seguir creciendo por diferenciación y elongación a partir de la diferenciación del brote correspondiente a la yema situada en la hoja justo por debajo de esa inflorescencia. Ese brote axilar produce un número de hojas y una nueva flor terminal, para reanudar el crecimiento a partir de la yema axilar situada por debajo de esa nueva inflorescencia y así consecutivamente.

Entre las plantas de crecimiento simpodial se encuentran las solanáceas, cucurbitáceas, orquídeas, leñosas, entre otros grupos de interés.

El "*crecimiento determinado*", a efectos de esta patente, es el hábito de crecimiento caracterizado por la producción de un número limitado de brotes simpodiales sobre el eje principal, después de la primera flor, resultando en una planta de altura más reducida. En el caso del tomate se consigue mediante mutación en el gen *self-pruning* en homocigosis.

Igualmente, el "*crecimiento semi-determinado*" es el hábito que presentan las plantas de crecimiento determinado, en el que producen un número mayor de brotes simpodiales que el genotipo de referencia en determinadas condiciones.

Y el "*crecimiento indeterminado*" es el presentado por muchas especies (todas las silvestres relacionadas con el tomate y muchas cultivadas) de tomate y típico de todas las "viñas", se caracteriza por un crecimiento simpodial, que se repite indefinidamente sobre el eje principal produciendo nuevos brotes con cada nueva inflorescencia terminal.

Asimismo, se considera que "*transgénesis*", en la presente invención, es el proceso mediante el cual se introduce una secuencia de DNA que contiene al menos una región no presente en el genoma del organismo inicial.

"*Planta modificada genéticamente*" (planta transgénica) se refiere, en la presente invención, a plantas cuyo material genético ha sido modificado deliberadamente con el fin de modificar la expresión de la proteína DELLA u ortóloga. La modificación genética puede realizarse tanto mediante una mutagénesis dirigida como a través de mutaciones no dirigidas. En la presente invención, "*mutagénesis dirigida*" se refiere a una modificación genética concreta, en la que se modifica específicamente una cadena nucleotídica en el genoma de una célula de planta. "*Mutagénesis no dirigida*" se refiere a la mutagénesis del genoma celular sin dirigir la mutación, es decir no se conoce de antemano qué mutación se va a generar, dónde o el efecto que dicha mutación ejercerá sobre la célula y/o planta.

El término "*planta correspondiente no modificada genéticamente*" (planta silvestre) se refiere en la presente invención a plantas cuyo material genético no ha sido modificado.

"*Gen ortólogo*" en la presente invención se refiere a genes homólogos en diferentes especies que codifican "*proteínas ortólogas*" que catalizan la misma reacción (es decir, con una misma función) en plantas.

ES 2 364 932 A1

En la presente invención se describen nuevas funciones y usos del gen *SIDELLA* de *Solanum lycopersicum* junto con versiones mutantes del gen asociadas a los nuevos fenotipos. Estos nuevos caracteres genotípicos incluyen la modificación del hábito de crecimiento y del metabolismo. Plantas genéticamente modificadas en *SIDELLA* o formas mutantes alélicas de esta proteína pueden utilizarse para incrementar el número de repeticiones simpodiales en un fondo genético determinado con el correspondiente incremento en el número de inflorescencias y de frutos, y por otra parte producir frutos con un contenido metabólico modificado, incluido el de los volátiles asociados al aroma.

La presente invención está relacionada con el control genético del crecimiento y más concretamente con el hábito de crecimiento que determina el crecimiento simpodial determinado o no de una planta. Más concretamente esta invención está relacionada con la utilización del gen *SIDELLA* para modificar ese aspecto del desarrollo mediante estrategias de ingeniería genética y de TILLING seguidas de mejora asistida por marcadores utilizando las formas mutantes de este gen.

Un primer aspecto de esta invención se basa en la identificación de una nueva función de la proteína DELLA no previamente descrita y que proporciona una forma de alterar el hábito de crecimiento determinado de plantas (en nuestro caso de plantas de tomate portadoras de la mutación *sp/sp*). Esta forma de alterar el hábito de crecimiento en tomate consiste en utilizar una construcción *asDELLA* para disminuir los niveles endógenos del regulador *SIDELLA* en plantas transgénicas. Las plantas transgénicas así producidas presentan un fenotipo de planta semideterminada a indeterminada con una mayor producción de flores y frutos en el eje principal, sin alterar significativamente el tiempo de floración.

Otro aspecto de la presente invención, y dado que las proteínas DELLA se degradan tras el tratamiento con la hormona giberelina GAs (Dill *et al.* 2001; 2004; Gubler *et al.* 2002; Itoh *et al.* 2002; Silverstone *et al.*, 2001), se basa en otro método de variar el nivel de determinación (número y composición de las repeticiones simpodiales después de la primera flor) consistente en el tratamiento de la planta con concentraciones de GAs.

Otro aspecto de esta invención, y dado que existen formas de DELLA insensibles a GAs, es alterar el número y composición de las repeticiones simpodiales después de la primera flor de forma independiente de GAs y conferir un fenotipo de ganancia de función mediante utilización de una versión mutada de DELLA.

La nueva función de *SIDELLA* se puede conferir mediante transgénesis de forma análoga a la resultante de la utilización de una estrategia de *asDELLA* como se describe en el ejemplo 1 o mediante sobre expresión de versiones mutadas, incluidas las de ganancia de función (supresión tipo *gai* en *asDELLA* o relacionadas).

En otro aspecto de la presente invención se propone un método para identificar mutantes, derivados, variantes y alelos de esa proteína de plantas mutagenizadas y que resulten en características funcionales nuevas que modifiquen en diferente grado el número y composición de las repeticiones simpodiales, produciendo así plantas con un número de flores y porte adaptado a las necesidades. Los cambios en la proteína pueden ser uno o más de los siguientes: adición, inserción, supresión o sustitución de uno o más nucleótidos que resulte en cambios en la secuencia de aminoácidos o no.

La presente invención también suministra la construcción nucleocáidica o vector que comprende un promotor desde el cual se exprese la secuencia de *SIDELLA* en orientación antisentido. La construcción o vector esta diseñada para su expresión en una célula, especialmente de tipo vegetal. Dicha célula vegetal que expresa esa construcción en antisentido está también comprendida en esta invención. Esta construcción cuando se inserta en el genoma de la planta dirige la expresión de la cadena complementaria de mRNA de *SIDELLA* ocasionando la disminución de los niveles de la cadena codificante expresada endógenamente. Dicha disminución también puede obtenerse por otros métodos como RNAi, microRNA, etc.

Dicha construcción o vector que contenga el *SIDELLA* en antisentido, RNAi, etc., contendrá generalmente un promotor u otra secuencia reguladora.

La persona experta en la materia conoce métodos para realizar dichas construcciones que contengan las señales y elementos necesarios para su expresión en plantas y obtener plantas transgénicas portadoras de dichas construcciones y que expresen el gen de forma constitutiva o inducida. Para más detalles se pueden ver, por ejemplo: "*Molecular Cloning: a Laboratory Manual*", 2nd edition, Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. "*Protocols in Molecular Biology*", Second Edition, Ausubel *et al.* ed., John Wiley & Sons, 1992. "Specific procedures and vectors previously used with wide success upon plants" are described by Bevan, Nucl. Acids Res. (1984) 12, 8711-8721), and Guerineau and Mullineaux, (1993); "Plant transformation and expression vectors", In: Plant Molecular Biology Labfax (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, pp 121-148.

La presente invención se puede llevar a cabo en cualquier planta, especialmente de crecimiento simpodial, aparte de tomate (ie cucurbitáceas o orquídeas, etc) en las que se puede aislar e identificar el ortólogo de *SIDELLA* mediante PCR con oligos conservados y llevar a cabo una aproximación similar. Alternativamente se pueden rastrear librerías de ácidos nucleicos con sondas heterólogas. Las personas conocedoras del arte pueden llevar a cabo estos procedimientos sin problemas y llevar a cabo construcciones y transformación genética de forma similar para obtener una alteración del fenotipo descrito en esa plantas.

En otro aspecto de la presente invención se presentan secuencias mutantes de *SIDELLA* que confieren alteraciones en la nueva función descrita y que resultan en plantas de tomate con un número mayor de simpodios que la variedad que aporta el fondo genético y con un número mayor de inflorescencias y alteración de la composición simpodial.

5 En otro aspecto de la invención se proporciona la forma de producir e identificar nuevas versiones de DELLA (o proteína ortóloga) que estén afectadas en esta nueva función y que resulten de interés. Actuando sobre DELLA (o proteína ortóloga) podemos alterar no sólo la longitud de los entrenudos sino el número de brotes simpodiales sobre el eje principal y, en consecuencia, el número de inflorescencias y frutos asociados. Concretamente, permite en el caso de plantas de tomate de crecimiento determinado (*sp/sp*) convertirla en indeterminado.

10 En otro aspecto de la presente invención la alteración de *SIDELLA* (o gen ortólogo) ocasiona en el fruto cambios en el contenido sustancial del mismo que afectaran sus características nutricionales y organolépticas. Las características organolépticas, nutricionales y de salud de los frutos son consecuencia directa del contenido en una serie de moléculas presentes en el mismo. Concretamente el sabor y aroma del tomate está relacionado con la concentración y cantidades
15 relativas de azúcares (fundamentalmente glucosa y fructosa) y de ácidos orgánicos (málico, cítrico) y de los compuestos volátiles que contribuyen al aroma (al menos 14 compuestos volátiles). El sabor y el aroma son unos caracteres a menudo olvidados en los programas de mejora más recientes, donde el énfasis ha sido en la productividad, larga vida de los frutos, etc, con la consecuente demanda social por frutos con mejores o diferentes sabores. En la presente patente se muestra que es posible modificar el contenido relativo de compuestos volátiles, de azúcares y de aminoácidos
20 en el fruto del tomate actuando a nivel de *SIDELLA*.

El método consiste en utilizar variabilidad natural o generada mediante mutágenos e identificar las variantes mutadas mediante TILLING o similar. El TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) es una tecnología dirigida a la identificación de mutantes en un gen de interés de secuencia conocida y se aplica a todo tipo de organismos, desde plantas hasta animales o bacterias (McCallum *et al.*, 2000; Till *et al.*, 2004; Slade *et al.*, 2005). Esta tecnología proporciona una forma de obtener mutantes en un gen y en nuestro caso se utilizó para encontrar mutantes en *SIDELLA*, ya que sabíamos que el TILLING combina protocolos de mutagénesis con la PCR y un método para detección de polimorfismos en el DNA.

30 Ello resulta en la identificación de formas mutadas como las que se presentan en las Figuras de la 4 a la 11. Algunas de las mutaciones son silenciosas, pero otras resultan en cambios notables en el número de simpodios y en la composición de estos incluyendo un mayor número de flores por simpodio. Aunque no sabemos exactamente cuáles son los residuos más importantes para la nueva función de interés, se entiende en general que aquellas mutaciones que ocasionen cambios conservativos, es decir provocan un cambio aminoacídico de por ejemplo un aminoácido hidrofóbico por otro hidrofóbico, o uno ácido por otro ácido no resultan a menudo en cambios sustanciales en la actividad de la proteína. Por otro lado, cambios no conservativos como pueden ser un aminoácido ácido por un básico o uno polar por uno hidrofóbico alteran de forma importante la función. De especial importancia es que afecte la nueva función alterando en menor medida otras funciones ya descritas como la longitud del entrenudo o la fertilidad. La descripción de nuevas mutaciones puede permitir definir mejor lo aminoácidos más relevantes para cada caso.

40 En otro aspecto de la presente invención se proporcionan mutaciones concretas (ver Figuras tabla 3, 4 y figura 12) que proporcionan cambios en el número y composición de los simpodios alterando sólo levemente la longitud de los entrenudos u otros aspectos del fenotipo.

45 Es posible, mediante la utilización de una técnica de TILLING similar a la utilizada aquí, identificar nuevos alelos que proporcionen intensidades de alteración del número de simpodios y de composición de los mismos (incluido el número de flores) que mejor se adapte a las necesidades o deseos del obtentor, rastreando un número suficiente de mutantes y caracterizando dicha colección.

50 Otros mutantes en DELLA afectados en esta nueva función son también objeto de la presente invención.

También representan un aspecto de la presente intención, cualquier célula, especialmente vegetal, que contenga la construcción dirigida a modificar los niveles de expresión de DELLA o que contenga mutantes puntuales en DELLA afectados en esta nueva función.

55 La presente invención también comprende la planta que comprenda dicha célula portadora de la construcción o de la mutación en *SIDELLA*.

60 Además de la planta, la presente invención proporciona cualquier clon de dicha planta, semilla de autofecundación o híbrida y sus descendiente y cualquier parte de ellos como esquejes, semillas, etc. que pueda ser utilizado para propagar dicho material.

La presente invención también proporciona un método para influenciar dicho nuevo fenotipo, como es el tratamiento con GAs o activadores o inhibidores de su síntesis o mecanismo de acción.

65 La presente invención también proporciona un método para utilizar mutaciones de ganancia de función en DELLA (supresiones en la proteína tipo mutante *gai*) para alterar el fenotipo en el sentido contrario (disminuir el número de simpodios o de flores por repetición simpodial).

ES 2 364 932 A1

De especial relevancia es que se proporciona un método para aumentar el número de simpodios manteniendo (mutantes puntuales o mayor nivel de represión) o no (alto nivel de represión o mutantes nulos) el carácter determinado y el número de flores por simpodio, lo que repercute en el número de frutos.

5 Debería de ser posible para cualquier persona experimentada en el arte de introducir variaciones en esta estrategia en la que la disminución en los niveles de DELLA o la expresión de formas mutadas de DELLA se hiciera de forma inducible o mediante promotores específicos. Por ejemplo las construcciones como las indicadas arriba o versiones mutadas como las descritas controladas por un promotor específico o inducible. Ello permitiría afectar al número de simpodios y la composición de los frutos de forma más dirigida.

10 Existen promotores específicos, así como inducibles, que pueden ser muy útiles para realizar esas nuevas aplicaciones y procedimientos de transformación para la mayor parte de las plantas de cultivo y muchas ornamentales.

15 Ejemplos

Ejemplo 1

20 *Incremento del número de repeticiones simpodiales mediante inhibición de los niveles de expresión del gen SIDELLA en plantas transgénicas de tomate*

La secuencia codificante del gen *SIDELLA* (SEQ ID No. 1 y 2) se colocó en orientación antisentido bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (ver esquema Figura 1) (La secuencia del cDNA de *SIDELLA* ya se ha publicado y se ha utilizado en esta construcción), y se introdujo en plantas de tomate (25 *Solanum lycopersicum* UC82 sp/sp) mediante transformación mediada por *Agrobacterium* siguiendo procedimientos establecidos (Ellul *et al.* 2003). Se seleccionaron plantas homocigotas para el transgen y se evaluó el tamaño de la planta a lo largo del tiempo, el número de entrenudos y la longitud de estos, el número de hojas hasta la primera inflorescencia, y la composición del metámero simpodial, y los resultados se muestran en las Figuras 3, tablas 1 y 2.

30 Las plantas UC82 (sp/sp) portadoras de la mutación *self-pruning* en homocigosis presentan el característico hábito determinado, formando la primera inflorescencia después de unas 10 hojas y terminando su crecimiento tras producir 3 metámeros simpodiales. Las líneas transgénicas de tomate UC82 (sp/sp) portadoras de la construcción asDELLA muestran niveles disminuidos en *SIDELLA* (Figura 2) y un porte (hábito de crecimiento) alterado (Figura 3, tablas 1 y 35 2). No sólo las plantas son más altas por una mayor longitud de los entrenudos, sino porque el crecimiento del brote principal no se detiene como en UC82 (sp/sp) tras tres metámeros simpodiales sino que continúa creciendo mediante la adición de nuevas unidades que depende de la línea transgénica, desde 8 simpodios (línea asDELLA 24B) hasta incluso adquirir crecimiento indeterminado (líneas asDELLA 5A y 7C).

40 TABLA 1

Efecto de la disminución en la expresión de SIDELLA en las plantas transgénicas sobre su altura, número y longitud de los entrenudos, tiempo de floración y composición de metámeros. A: datos relativos a 5 plantas silvestres (wt).

45 *B: Datos relativos a 4 plantas asDELLA, línea 5A y C: Datos relativos a 3 plantas asDELLA, línea 24B*

A.

50

	Altura (cm)	nº EN	long EN	nº hojas 1ª inflorescencia	nª hojas (H) entre inflorescencias consecutivas
55 wt-1	94	15	6.27	10	1H +2H + 1H (Terminal)
wt-2	84	13	6.46	10	1H +1H + 1H (T)
60 wt-3	78	13	6.00	9	1H +1H + 1H (T)
wt-4	76	12	6.33	10	1H +1H (T)
65 wt-5	95	14	6.79	10	1H +1H + 1H (T)

B.

asDELLA	Altura (cm)	n° EN	log EN	n° hojas 1ª inflorescencia	nª hojas (H) entre inflorescências consecutivas
5A-1	290	26	11.15	14	2H +3H + 2H +2H +2H + 2H
5A-2	226	24	9.42	12	1H +3H + 2H +2H +2H + 2H
5A-4	300	26	11.54	13	3H +3H + 2H +2H +3H + 2H
5A-5	225	22	10.23	13	2H +2H + 2H +2H

C.

asDELLA	Altura (cm)	n° EN	long EN	n° hojas 1ª inflorescencia	nª hojas (H) entre inflorescências consecutivas
24B-1	140	17	8.2	9	1H-1H-2H-2H
24B-2	140	17	8.2	10	2H-2H-2H
24B-3	160	18	8.9	10	1H-2H-2H-2H

En la tabla 1 se observa la mayor altura de las plantas transgénicas en relación a las silvestres, así como un aumento en el número y longitud de sus entrenudos. Por otro lado se comprueba que el tiempo de floración, medido como número de hojas hasta la aparición de la primera inflorescencia, sólo se retrasa algo en las plantas 5A. En cuanto a la composición de los metámeros, se observa que en las plantas silvestres las inflorescencias aparecen en hojas consecutivas y el crecimiento de la plantas se detiene tras tres inflorescencias, mientras que en las asDELLA la inflorescencia aparece cada 2 ó 3 hojas y continua formando metámeros adicionales de forma indefinida cuando las silvestres ya han dejado de crecer.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 364 932 A1

TABLA 2

Efecto de la disminución en la expresión de SIDELLA sobre el hábito de crecimiento de las plantas transgénicas. Los datos corresponden a la media de 4 plantas por genotipo. Se observa la variación en la composición de los metámeros de las líneas asDELLA y el cambio de tipo de crecimiento en las mismas de determinado a indeterminado o semi-determinado (más de 10 repeticiones simpodiales)

Genotipo	nº días 1ª inflorescencia	nº hojas 1ª inflorescencia	Composició n metámero	Nº metámeros hasta la determinación
wt	44.0±2.1	9.6±0.5	H-F	3-4
asDELLA-5A	49.4±1.8	12.8±0.8	H-H-F	indeterminado
asDELLA-24B	44.1±1.9	9.7±06	H-H-F	Semi- determinado (10 simpodios)

El cDNA correspondiente a *SIDELLA* (SEQ. ID. No. 1 y 2) se aisló a partir de una genoteca de expresión en Lambda ZAP de ovarios de tomate (*Solanum lycopersicum L. cv Rutgers*) emasculados un día antes de la antesis. El gen *SIDELLA* se rastreó a partir de las colonias obtenidas (40000) de la genoteca de expresión utilizando como sonda la región codificante completa (cDNA) (1750 pb) del gen mutado gaidel de *Arabidopsis thaliana* (*Atgaidel*). La hibridación de los filtros de nitrocelulosa obtenidos de las placas de lisis se realizó a 46°C durante 6 h. Los filtros de nitrocelulosa se lavaron dos veces con 2 x SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente durante 5 min y una vez con 0.1 x SSC, 0.1% SDS a 46°C durante 22 minutos. Se obtuvieron 15 clones positivos correspondientes todos al mismo gen, aislándose y secuenciándose el más largo de ellos (2389 pb). Este clon contenía una ORF de 1764 pb capaz de sintetizar una proteína de 588 aminoácidos con un peso molecular de 64,45 KDa y un punto isoelectrónico teórico de 5.07. La comparación de la secuencia proteica deducida con las existentes en los bancos de datos, mostró que el clon aislado era un ortólogo en tomate de los genes DELLA.

Posteriormente, el gen se clonó en dirección antisentido en el plásmido pBINJIT60 bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico del tabaco (35S::SIDELLA_{as}). El plásmido binario, pBINJIT60, se utilizó para la obtención de plantas transgénicas de *Lycopersicon esculentum* mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. Este plásmido está construido a partir del "casette" del plásmido pJIT60, que aporta el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con el "enhancer" duplicado (2x35S), el sitio de clonación múltiple del pUC9 y la secuencia de poliadenilación del CaMV, [CaMV poli (A)+] (Guerineau *et al.*, 1992), extraído como fragmento KpnI y XhoI, y subclonado en los sitios KpnI y SalI del plásmido binario pBIN19. El pBIN19 contiene el gen NPTII, que confiere resistencia a la kanamicina, fusionado al promotor y al terminador de la nopalina sintetasa (pnos y tnos), incluido en el T-DNA (Bevan, 1984). El vector resultante pBINJIT posee un tamaño de 13,2 kb aproximadamente y presenta como sitios únicos de clonaje SalI, BamHI y SmaI. Para clonar asDELLA en antisentido en este vector, se amplificó mediante PCR su secuencia genómica completa utilizando los oligonucleótidos TGxC7 (5'-CCAG CACTTGTCATTCTTACC-3' SEQ. ID. No. 13) y TGxC8 (5'-CATCTCTCTCATGTCTCTTCC-3' SEQ. ID. No. 14). El producto de 1800 pb se digirió con EcoRV y subclonó en el vector pBSK, eligiéndose aquellos clones en los que *SIDELLA* se había clonado en antisentido para subclonarlo en el vector binario pBINJIT?O utilizando los sitios SmaI/SalI.

Con el fin de reducir los niveles endógenos de *SIDELLA*, esta construcción fue introducida en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación para su utilización posterior en la transformación de tomate a partir de explantes de cotiledón (Ellul *et al.*, 2003). Se seleccionaron plantas homocigotas para el transgen y se comprobó, mediante RT-PCR semicuantitativa, que efectivamente mostraban disminución del nivel de expresión de *SIDELLA* endógeno (Figura 2). En estas mismas plantas se evaluó, a lo largo del tiempo, su altura, el número de entrenudos y la longitud de estos, el número de hojas hasta la primera inflorescencia, y la composición del metámero simpodial. Los resultados se muestran en las Figuras 3 y tablas 1 y 2.

Ejemplo 2

Obtención e identificación de alelos SIDEELLA de tomate en M82 (sp/sp)

5 Con objeto de identificar alelos mutados en el gen *SIDEELLA* que pudieran proporcionar diferentes intensidades del nuevo fenotipo se utilizó una estrategia de TILLING.

El TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) es una tecnología dirigida a la identificación de mutantes en un gen de interés de secuencia conocida y se aplica a todo tipo de organismos desde plantas hasta animales o bacterias (McCallum *et al.*, 2000; Till *et al.*, 2004; Slade *et al.*, 2005). Esta tecnología proporciona una forma de obtener mutantes en un gen y en nuestro caso se utilizó para encontrar mutantes en *SIDEELLA* ya que sabíamos que el TILLING combina protocolos de mutagénesis con la PCR y un método para detección de polimorfismos en el DNA. Existen muchas formas de mutagenizar poblaciones y diferentes formas de identificar mutantes puntuales en un conjunto de materiales (Mccollum *et al.*, 2004; Gady *et al.*, 2009) En nuestro caso el método TILLING combina la inducción de un gran número de mutaciones puntuales al azar ocasionadas por el Ethyl Methane Sulfonate (EMS) que produjo una población de 12,000 M2 familias en la variedad de tomate determinado M82 (Menda *et al.*, 2004). Se extrajo el DNA de cada una de las familias y se combinó siguiendo una estrategia de 3D para disminuir el número de reacciones de PCRs a realizar. Para el rastreo TILLING, el locus de interés *SIDEELLA* se amplificó de cada uno de los pools mediante una PCR anidada y cebadores universales. La primera amplificación PCR es una reacción estándar de PCR que utiliza cebadores específicos del gen diana *SIDEELLA* según se indica en (Qiu *et al.*, 2004). Para la reacción específica se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: *SIDEELLA*-ext-F1 5'cattctctaattggctgttttcttc3' (SEQ. ID. No. 15); *SIDEELLA*-ext-R1: 5'aggtagctataagtggccgtgtatg3' (SEQ. ID. No. 16); *SIDEELLA*-F1: 5'gaaaagtaagattgggaagaaga3' (SEQ. ID. No. 17); *SIDEELLA*-R1 5'ctaaagcatggaagctgtttgaa3' (SEQ. ID. No. 18). Las condiciones de amplificación fueron de 1 min a 94°C y 30 ciclos de (10 s a 94°C, 20 s a 63°C, 1 min a 72°C) y 5 min a 72°C cuando se utilizan los oligonucleótidos *SIDEELLA*-ext-R1 y *SIDEELLA*-ext-F1.

Se utilizó un microlitro de la primera PCR como molde para una segunda reacción de amplificación PCR anidada, utilizando una mezcla de oligonucleótidos específicos internos que llevaban una cola de M13 universal, combinando con los cebadores de M13 universales. M13F700 (CACGACGTTGTAAAACGAC; SEQ. ID. No. 19) y M13R800 (GGATAACAATTCACACAGG; SEQ. ID. No. 20), marcados en el extremo 5' con marcas fluorescentes IRD700 e IRD800 (LI-COR®, Lincoln, Nebraska, USA), respectivamente. Esta reacción de PCR se llevó a cabo utilizando cada cebador a la concentración de 0.1 µM, y el siguiente programa de ciclos en dos pasos: 94°C durante 2 min, 10 ciclos a 94°C durante 15 s, una temperatura de anillamiento de cebadores específicos durante 30 s y 72°C durante 1 min, seguido de 25 ciclos a 94°C durante 15 s, 50°C durante 30 s y 72°C durante 1 min, y al final una extensión de 5 min a 72°C.

La detección de mutaciones en productos de PCR no purificados se llevó a cabo según se indica en Triques *et al.*, 2007, excepto que el extracto enzimático se utilizó a una dilución de 1 a 10 000 y se cargaron 0.6 µl de productos de la digestión con ENDO1 en el gel de secuenciación. Los mutantes se evidenciaron por ocupar una posición diferente en el gel de secuenciación, y por deconvolución de las diferentes líneas mezcladas en el pool. El mutante presente en el pool se confirmó individualmente y la mutación se secuenció siguiendo procedimientos estándar.

Sólo se presentan aquellas mutaciones identificadas que suponen un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína, destacando aquellas que dan cambio no conservado en el aminoácido correspondiente (i.e. ácido por básico o prolina por otro, etc.) y que es de esperar por tanto que resulten en una alteración en el nuevo fenotipo descrito mediado por *SIDEELLA*.

Se identificaron de esa forma una serie de alelos mutantes que tras su secuenciación resultaron presentar alteraciones respecto a la secuencia de *SIDEELLA* del cultivar determinado M82 (SEQ. ID. No 11 y 12) denominados mutantes TILLING 1 (SEQ. ID. No 3 y 4), TILLING 2 (SEQ. ID. No 5 y 6), TILLING 3 (SEQ. ID. No 7 y 8), y TILLING 4 (SEQ. ID. No 9 y 10) que se muestran en las Figuras 4 a 7.

En el mutante TILLING 1 a nivel nucleotídico (SEQ. ID. No. 3) existe una sustitución de guanina por adenina (en el nucleótido 458) y a nivel aminoacídico (SEQ. ID. No. 4) existe una sustitución de alanina por treonina (en el aminoácido 153).

En el mutante TILLING 2 a nivel nucleotídico (SEQ. ID. No. 5) existe una sustitución de guanina por adenina (en el nucleótido 1498) y a nivel aminoacídico (SEQ. ID. No. 6) existe una sustitución de glutamina por lisina (en el aminoácido 500).

En el mutante TILLING 3 a nivel nucleotídico (SEQ. ID. No. 7) existe una sustitución de citosina por timina (en el nucleótido 994) y a nivel aminoacídico (SEQ. ID. No. 8) existe una sustitución de leucina por fenilalanina (en el aminoácido 332).

En el mutante TILLING 4 a nivel nucleotídico (SEQ. ID. No. 9) existe una sustitución de citosina por timina (en el nucleótido 661) y a nivel aminoacídico (SEQ. ID. No. 10) existe una sustitución de leucina por fenilalanina (en el aminoácido 221).

ES 2 364 932 A1

También se realizó un apilamiento de la estructura primaria de la proteína *SIDELLA* para cada una de las mutaciones junto con otras proteínas DELLA de otras especies vegetales con el fin de ver el grado de conservación del aminoácido mutado y en que región de la proteína se producía este (Figuras 8 a 11). Salvo en el mutante TILLING 1, todas las mutaciones se producen en regiones muy conservadas de la proteína.

5

Ejemplo 3

Alteración en el hábito de crecimiento en plantas portadoras de alelos mutados de SIDELLA

10

Para llevar a cabo un estudio del efecto que sobre el fenotipo ocasionan las nuevas mutaciones obtenidas en *SIDELLA*, se hizo un pequeño “mini breeding”. Para ello, las líneas portadoras de las diferentes mutaciones TILLING 1 (SEQ. ID. No 3 y 4), TILLING 2 (SEQ. ID. No 5 y 6), TILLING 3 (SEQ. ID. No 7 y 8) y TILLING 4 (SEQ. ID. No 9 y 10) se autofecundaron y se seleccionaron plantas descendientes que eran portadoras de la mutación en homocigosis, heterocigosis o azigóticas. Dichos materiales se caracterizaron a continuación.

15

Se hizo un seguimiento del hábito de crecimiento de estas plantas y que se resume en las tablas 3 y 4. En dichas tablas se muestra que las mutaciones en DELLA señaladas en la tabla producen un fenotipo de planta de mayor altura y de crecimiento semideterminado en comparación con su fondo silvestre que es determinado.

20

En la Figura 12 se puede ver el aspecto general de las plantas que llevan mutaciones puntuales en *SIDELLA* identificadas por TILLING. Lo más destacable es que líneas presentan un fenotipo que es básicamente el del fondo silvestre no modificado UC82 excepto en el mayor número de repeticiones simpodiales que se obtienen a partir de la primera inflorescencia, lo que resulta en un mayor número de hojas e inflorescencias antes de detenerse el crecimiento, lo que implica, según puede observarse, plantas de mayor porte y, en consecuencia, mayor biomasa y número de frutos.

25

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 3

Resumen de los cambios causados por las mutaciones de TILLING a nivel de nucleótido y de aminoácido, entorno del cambio aminoacídico, tipo de mutación y efecto sobre el hábito de crecimiento de la planta portadora de la mutación. El efecto de estas mutaciones puntuales en *SIDE*LLA es el cambio de hábito de crecimiento de la planta, pasando de ser de tipo determinado a semideterminado a semideterminado, siendo **nt**: nucleótido; **aa**: aminoácido; **wt**: silvestre; **mt**: mutación

Genotipo	Mutación nt w/posición/nt mt aa w/ posición/aa mt	Entorno cambio aminoacídico	Tipo de cambio	Fenotipo mutación	Hábito de crecimiento
<u>mt</u> - TILLING 1	G / 458 / A Ala (A) / 153 / Thr(T)	133aa-QNHRTSTISDDDLRAIPGGAVFNSDNKRHRSTTSSFTTSSSMVT-180aa (entorno poco conservado)	aa hidrofobo /aa hidrófilo	Homozigoto	Semi- indeterminado
<u>mt</u> - TILLING 2	G / 1498 / A Glu (E) / 500 / Lys(K)	491aa-QICNVAC <u>E</u> GSDRVERHETLNQWRVRMNSSGFDVHLGSNAFKQASM- 339aa (entorno conservado)	aa ácido/aa básico	Heterozigoto	Semi- indeterminado
<u>mt</u> - TILLING 3	C / 994 / T Leu (L) / 332 / Phe(F)	287aa-QAILEAFTGCNKVHVIDFSLKQGMQWPALMQALALRPGPPA <u>FRLTGIG</u> - 337aa (entorno muy conservado)	aa hidrofobo /aa hidrofobo	Homozigoto Homozigoto	Semi- indeterminado Semi- indeterminado
<u>mt</u> - TILLING 4	C / 661 / T Leu (L) / 221 / Phe(F)	185aa- WLVDSQETGVRLVHTLMACAEAVQENITLADQLVHRHIGILAVSOSGAMRKVAT YFAEALARRI-252aa (entorno conservado)	aa hidrofobo /aa hidrofobo	Homozigoto	Semi- indeterminado

TABLA 4

Efecto de las mutaciones puntuales en *SIDELLA* sobre diferentes parámetros de crecimiento: altura, número total de entrenudos y longitud de los mismos, número de hojas hasta la primera inflorescencia, composición de los metámeros simpodiales. Las plantas mutantes presentan una mayor altura, mayor número y longitud de los entrenudos, así como un aumento en el número de metámeros respecto al tipo silvestre que dota a la planta de un crecimiento semideterminado

Genotipo	Altura (cm)	n° EN	long EN	N° hoja 1ª inflorescencia	N° de hojas entre inflorescencias consecutivas
wt M82-1	80	15	5.3	10	1H-2H-2H
wt M82-2	90	21	4.3	12	1H-2H-2H-2H-2H
wt M82-3	80	18	4	11	3H-2H-2H
mt TILLING 1-5 Homozigosis	170	25	6.8	10	1H-2H-1H-2H-1H-2H-1H-2H-1H
mt TILLING 2-1 Heterozigosis	160	22	7.3	10	2H-2H-1H-2H-3H-2H
mt TILLING 3-2 Homozigosis	150	19	7.9	10	2H-1H-2H-3H-2H
mt TILLING 3-3 Homozigosis	150	23	6.5	11	1H-2H-1H-1H-1H-2H-2H
mt TILLING 4-2 Homozigosis	150	26	5.8	10	5H-2H-2H-1H-1H-2H-1H-1H-1H

Una vez conocido tanto las secuencias genéticas y aminoacídicas de los mutantes TILLING (SEQ. ID No 3-9), resultaría fácil para un experto en la materia generar plantas transgénicas que contengan dichas mutaciones empleando técnicas conocidas del estado de la técnica.

Ejemplo 4

Alteración en el contenido de metabolitos en el fruto como consecuencia de la modificación en SIDELLA

Una observación preliminar de los frutos de las plantas asDELLA indicaba que el contenido en sólidos solubles totales había aumentado en relación con los frutos de plantas no modificadas. Con objeto de averiguar si los frutos as*SIDELLA* tenían alterada la composición metabólica se analizaron el contenido de compuestos volátiles y metabolitos primarios de frutos maduros de las líneas asDELLA, tanto partenocárpicas como con semillas, y se compararon con dos grupos de silvestres, un grupo de silvestres sin tratar y el otro grupo de silvestres que habían sido tratados por spray con una solución 10 uM de GA1+3.

Los metabolitos analizados tienen un efecto determinante sobre las cualidades organolépticas y nutritivas del tomate, ya que los compuestos volátiles son los responsables del aroma, mientras que algunos de los metabolitos primarios analizados, entre los que se incluyen los azúcares glucosa y fructosa, los ácidos orgánicos cítrico, málico y succínico, y varios aminoácidos, tienen una contribución decisiva sobre el sabor y el contenido nutricional de los frutos.

ES 2 364 932 A1

Los resultados indican un cambio en el contenido tanto de metabolitos primarios como de aromas en las muestras asDELLA, que puede imitarse mediante tratamiento de los frutos silvestres con GAs, como se muestra más adelante. Esta nueva función de SIDELLA y de las GAs en cambiar el perfil metabólico del fruto es de interés para alterar las propiedades organolépticas del fruto. Además, se analizó si el contener o no semillas alteraba el contenido de metabolitos de los frutos asDELLA.

Análisis del perfil de volátiles

El análisis de compuestos volátiles se realizó básicamente utilizando el protocolo descrito en Zanor *et al.*, 2009, que se detalla a continuación. Para ello se recolectaron frutos de tomate en el estadio rojo maduro. Se tomaron trozos del pericarpo y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se trituraron con un molinillo de café (Moulinex de Luxe) y se guardaron a -80°C hasta el momento del análisis. Este mismo material se utilizó tanto para el análisis de compuestos volátiles como de metabolitos primarios.

Previamente a su análisis se pesaron 0,5 g de material en un vial de 7 ml y se incubó en baño de agua a 37°C durante 5 minutos, con el vial cerrado. Posteriormente se añadieron 0,5 ml de una solución EDTA 100 mM a pH 7,5 y 1,1 g de CaCl₂·2H₂O. Inmediatamente se cerró el vial de nuevo, se agitó vigorosamente y se sonicó durante 5 minutos. Finalmente, 1 ml de este extracto se llevó a un vial de espacio de cabeza de 10 ml, sobre el cual se realizó el análisis. Los volátiles se capturaron en el espacio de cabeza por microextracción en fase sólida (SPME). La fibra utilizada tiene un recubrimiento de 65 µm de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS/DVB) (SUPELCO). Los viales se atemperaron a 50°C durante 10 minutos y, posteriormente, la fibra estuvo expuesta al, espacio de cabeza, durante 20 minutos, a la misma temperatura. La adquisición de volátiles en la fibra y posterior desorción se realizó de manera automatizada con un CombiPAL (CTC Analytics).

Para la separación cromatográfica y la detección de los volátiles adsorbidos a la fibra PDMS/DVB, estos se desorbieron en el puerto de inyección a 250°C de un cromatógrafo de gases Agilent 6890N durante 1 minuto. Las condiciones cromatográficas se describen a continuación. Gas portador: helio, 1,2 ml/min. Columna: DB-5 ms (60 m, 0,25 mm, 1 µm) (J&W Scientific). Temperatura: 40°C durante 2 min, rampa de 5°C/min hasta 260°C y luego 260°C durante 5 min. La detección se realizó mediante un espectrómetro de masas Agilent 5975B en el modo sean, en el rango de m/z 35-220, a 7 scans/s, temperatura de la fuente de ionización 230°C y energía de ionización 70 eV. Los cromatogramas se procesaron con el software MSD ChemStation Enhanced Data Analysis (Agilent Technologies).

Los resultados (según se puede ver en la tabla 5) indican un cambio en el contenido de volátiles en las muestras asDELLA que además puede imitarse mediante tratamiento de los frutos silvestres con GAs. Los cambios observados en la asDELLA se detectan tanto en los frutos con semillas (tamaño igual que el Silvestre) como sin semillas (menor tamaño). Concretamente se observa un aumento significativo de los volátiles que contribuyen al aroma siguientes: beta-damascenona, 1-penten-3-ona y (E)-2-hexenal, que poseen valores de al menos el doble en las asDELLA o en las tratadas. Otros compuestos como el 3-metilbutanol, 1-nitro-2-feniletano, 2-feniletanol, fenilacetaldehído y 2-isobutiltiazol disminuyeron de forma importante en los frutos modificados. Los descriptores olfativos asociados a cada uno de estos compuestos de forma individual se pueden ver en la tabla 6.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 364 932 A1

TABLA 5

Modificación sobre el patrón de volátiles que contribuyen al aroma del tomate. Los frutos asDELLA, tanto los partenocárpico como los polinizados, tienen niveles aumentados de algunos de ellos, y disminuidos de otros. El tratamiento con GAs produce efectos semejantes. En negrita aparecen los compuestos cuyas diferencias respecto al WT tienen significación estadística ($p < 0,05$). **PI**: plantas WT pulverizadas 2 veces a la semana con una solución de giberelinas GA1+3 10 μ M; **AS C**: transgénicas asSIDElla sin tratamiento; **AS Pol**: transgénicas asSIDElla cuyas flores fueron polinizadas (y cuyos frutos tienen semilla); **WT**: Plantas control silvestres UC82

VOCs	AS C / WT	AS Pol / WT	PI / WT
(E)-2-hexenal	2.22	2.85	4.29
1-penten-3-ona	1.73	1.61	2.14
β -damascenona	1.72	2.22	2.09
β -ionona	1.45	1.73	1.34
Hexanal	1.43	1.49	1.36
(Z)-3-hexenal	1.22	0.99	1.19
Metil salicilato	1.19	1.60	0.87
(E)-2-heptenal	1.16	1.31	1.46
6-metil-5-hepten-2-ona	0.86	1.10	0.90
3-metilbutanol	0.19	0.12	0.21
1-nitro-2-feniletano	0.13	0.19	0.45
2-feniletanol	0.12	0.11	0.33
Fenilacetaldehido	0.09	0.08	0.33
2-isobutiltiazol	0.09	0.19	0.26

ES 2 364 932 A1

TABLA 6

Descriptorios asociados a los compuestos volátiles de aroma del tomate

5

10

15

20

25

30

35

VOCs	Aroma
(Z)-3-hexenal	Verde, hoja
β -ionona	Floral
Hexanal	Verde
β -damascenona	Floral
1-penten-3-ona	Acre
3-metilbutanal	Malta
(E)-2-hexenal	Verde, hoja
2-isobutiltiazol	Hoja de tomatara
1-nitro-2-feniletano	Floral, especiado
(E)-2-heptenal	Verde
Fenilacetaldehído	Floral, afrutado
6-metil-5-hepten-2-ona	Fruta verde
3-metilbutanol	Malta, tostado
Metil salicilato	Menta, farmacéutico

40

45

50

55

60

65

Otros compuestos volátiles que no parecen contribuir al aroma del fruto pero que pueden tener otras funciones, incluida la comunicación con otros organismos, se encuentran en niveles diferentes y de forma estadísticamente significativa, tanto en los frutos modificados asDELLA (con o sin semillas) como los tratados con GAs (tabla 7). Los más afectados en este caso son el 2-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol, que presentan niveles mucho menores. La importancia de dichos cambios en la adaptación a las condiciones ambientales, etc. está por esclarecer, pero muy probablemente afecte a la atracción o repulsión de diferentes organismos hacia el fruto.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 364 932 A1

TABLA 7

Modificación sobre el patrón de volátiles que no contribuyen al aroma del tomate. Los frutos asDELLA, tanto los partenocárpicos como los polinizados, tienen niveles aumentados de algunos de ellos, y disminuidos de otros. El tratamiento con GAs produce efectos semejantes. En negrita aparecen los compuestos cuyas diferencias respecto al WT tienen significación estadística ($p < 0,05$). **PI**: plantas WT pulverizadas 2 veces a la semana con una solución de giberelinas GA1+3 10 μ M; siendo **AS C**: transgénicas asSIDElla sin tratamiento; **AS Pol**: transgénicas asSIDElla cuyas flores fueron polinizadas (y cuyos frutos tienen semilla); **WT**: Plantas control silvestres UC82

VOCs	AS C / WT	AS Pol / WT	PI / WT
Ácido 3-metilbutanoico	2.94	2.81	5.35
(E,E)-2,4-decadienal	1.78	2.04	2.13
1-penten-3-ol	1.67	1.62	1.94
(E)-2-octenal	1.51	1.95	1.63
Pentanal	1.49	1.62	1.43
(E)-2-pentenal	1.49	1.22	1.75
Ácido hexanoico	1.48	1.43	1.63
(E,E)-2,4-hexadienal	1.36	1.22	1.51
2-pentilfurano	1.35	1.62	1.24
1-pentanol	1.29	1.23	1.48
2-etilfurano	1.22	1.23	1.20
Acetona	1.21	1.09	1.22
Ácido octanoico	1.21	1.01	1.40
3-metilbutanonitrilo	1.11	2.12	1.28
Ácido 2-etilhexanoico	1.00	0.96	1.23
Nonanal	0.97	0.88	0.68
Decanal	0.95	0.81	1.04

ES 2 364 932 A1

VOCs	AS C / WT	AS Pol / WT	PI / WT
Octanal	0.94	0.87	0.95
Geranial	0.90	1.16	0.93
Guayacol	0.89	1.16	0.53
Benzofenona	0.87	0.87	0.80
Acetofenona	0.87	0.79	1.19
Benzaldehído	0.60	0.51	0.75
Geranilacetona	0.52	0.51	0.49
Terpineol	0.49	0.75	0.44
Linalool	0.46	0.81	0.42
Bencil alcohol	0.36	0.24	0.53
Eugenol	0.22	0.18	0.08
Bencilnitrilo	0.11	0.12	0.40
2-metil-1-butanol	0.04	0.03	0.07
2-metil-1-propanol	0.00	0.00	0.00

Análisis de metabolitos primarios

El análisis de metabolitos primarios se realizó básicamente utilizando el protocolo descrito en Roessner-Tunali *et al.*, 2003, que se detalla a continuación, utilizándose el mismo material vegetal descrito anteriormente para el análisis de los elementos volátiles.

Para llevar a cabo el análisis, primero se realizó la extracción de los metabolitos. Se pesaron aproximadamente 250 mg de material vegetal, se le añadieron 3 ml de metanol y 120 μ l de una solución del patrón interno ribitol (0,2 mg/ml en agua), y se agitó vigorosamente en vórtex durante 20 s. Se transfirió a un vial de vidrio de 5 ml, se cerró y se incubó en baño de agua a 70°C durante 15 min. Posteriormente se le añadieron 1,5 ml de agua, se agitó en vórtex, y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min. Se tomaron 50 μ l del sobrenadante, se llevaron a un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se llevó a sequedad en un speed-vac durante 12 horas, a temperatura ambiente.

A continuación, los metabolitos extraídos se derivatizaron del siguiente modo. Se adicionaron 60 μ l de una solución de clorhidrato de O-metilhidroxilamina (30 mg/ml en piridina), y se mantuvo a 37°C en agitación durante 2 horas. Tras un pulso de centrifugación, se añadieron 120 μ l de N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) y 12 μ l de una mezcla de varios metilésteres de ácidos grasos (800 ng/ml de cada uno en cloroformo), y se mantuvo a 37°C, en agitación, durante 30 min. Finalmente, se transfirió a un vial GC de 2 ml con inserto de 200 μ l, desde el cual se realizó la inyección.

Para realizar la separación cromatográfica y la detección, se inyectó 1 μ l del extracto en el puerto de inyección a 230°C de un cromatógrafo de gases Agilent 6890N. Se realizaron dos inyecciones de cada extracto: una con split 1:20 para la determinación de los metabolitos más abundantes (fructosa y glucosa), y otra splitless para el resto de los metabolitos. Las condiciones cromatográficas se describen a continuación. Gas portador: helio, 2 ml/min. Columna BPX35 (30 m, 0,32 mm, 0,25 μ m) (SGE). Temperatura: 85°C durante 2 min, rampa de 15°C/min hasta 360°C.

La detección se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas PEGASUS 4D (LECO), en el rango de m/z 40-600, a 6,25 scans/s, temperatura de la fuente de ionización 200°C y energía de ionización 70 eV. Se aplicó un solvent delay de 150 s.

Para analizar los datos, los cromatogramas se procesaron con el software ChromaTOF-GC v3.32 (LECO). Las áreas obtenidas para cada compuesto se corrigieron respecto al patrón interno y al peso fresco exacto de cada muestra.

Los resultados (según se puede ver en la tabla 8) indican que los frutos asDELLA, tanto los partenocárpicos como los que tienen semillas, contienen niveles incrementados de sacarosa, así como de los aminoácidos tirosina, asparagina, isoleucina, treonina y prolina, entre otros metabolitos. El efecto sobre la acumulación de estos compuestos en los frutos asDELLA puede obtenerse en parte mediante el tratamiento con 10 μ M GA1+3.

ES 2 364 932 A1

TABLA 8

*Incremento de los niveles de diversos metabolitos con efectos sobre las cualidades organolépticas del tomate. Los frutos asDELLA, tanto los partenocárpicos como los polinizados, tienen niveles mayores de varios metabolitos, sobre todo de algunos azúcares y aminoácidos. El tratamiento con GAs produce efectos semejantes. En negrita aparecen los compuestos cuyas diferencias respecto al WT tienen significación estadística ($p < 0,05$). **PI**: plantas WT pulverizadas 2 veces a la semana con una solución de giberelinas GA1+3 10 μ M; **AS C**: transgénicas asSIDElla sin tratamiento; **AS Pol**: transgénicas asSIDElla cuyas flores fueron polinizadas (y cuyos frutos tienen semilla); **WT**: Plantas control silvestres UC82*

Metabolito	AS C / WT	AS Pol / WT	PI / WT
Sacarosa	2.95	3.33	4.36
Fructosa	1.16	1.23	1.09
Glucosa	1.12	1.26	1.07
Xilosa	1.04	0.99	0.91
Tirosina	4.00	4.65	1.93
Asparagina	2.24	2.41	4.22
Isoleucina	2.10	3.01	2.06
Treonina	1.86	2.47	2.20
Prolina	1.73	2.84	3.06
Ácido aspártico	1.33	1.79	1.90
Alanina	1.31	1.58	1.00
Glicina	1.19	1.65	1.26
Ácido glutámico	1.18	1.34	2.28
Fenilalanina	0.66	0.89	0.81
Ácido piroglutámico	1.48	2.19	2.49
GABA	0.95	1.36	1.20
β -alanina	0.89	1.11	1.04
Ácido succínico	1.61	2.42	1.42
Ácido fosfórico	1.70	1.77	2.41
Ácido cítrico	1.16	1.17	1.41
Ácido octadecanoico	1.03	1.01	1.01
Ácido tetradecanoico	1.02	1.03	1.04
Ácido málico	0.64	0.66	0.65
Mio-inositol	2.00	2.23	2.38
Eritritol	0.98	1.02	1.01
Glicerol	0.76	0.84	0.88
Putrescina	1.35	1.25	1.43

ES 2 364 932 A1

Esta nueva función de *SIDELLA* y de las GAs consistente en alterar el perfil metabólico del fruto es de interés, ya que permite modificar las propiedades organolépticas y nutricionales del fruto.

Referencias

- 5
- **Achard P. Vriezen W. H. Van Der Straeten D. and Harberd N. P. (2003)** Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* 15: 2816-2825.
 - **Achard P. Cheng, H. De Grauwe L. Decat J. Schoutteten H. Moritz T. Van der Straeten D. Peng J. R. and Harberd N. P. (2006)** Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91-94.
 - **Bevan M. (1984).** Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12:8711-21.
 - 15 • **Carmel-Goren L. Liu Y. S. Lifschitz E. Zamir D (2003)** The *SELF-PRUNING* gene family in tomato. *Plant Molecular Biology* 52: 1215-1222.
 - **Gubler F. Chandler P. M. White R. G. Llewellyn D. J. Jacobsen J. V. (2002)** Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of *SLN1* and *GAMYB* expression. *Plant Physiol.* 129: 191-200.
 - 20 • **Dill A. Jung H. S. y Sun T. P. (2001)** The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98: 14162-14167.
 - **Dill, A., Thomas, S. G., Hu, J., Steber, C. M., and Sun, T.-P. (2004).** The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16: 1392-1405.
 - 25 • **Doebley J. (2006).** Unfallen grains: how ancient farmers turned weeds into crops. *Science* 312: 1318-1319.
 - **Ellul P. Garcia-Sogo B. Pineda B. Rios G. Roig L. and Moreno V. (2003)** The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium* mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mili.) is genotype and procedure dependent. *Theor. Appl. Genet.* 106, 231-238
 - 30 • **Eshed Y. Zamir D. (1995).** An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* 141: 1147-1162.
 - 35 • **Foucher F. Morin J. Courtiade J. Cadioux S. Ellis N. Banfield M. J. Rameau C. (2003).** DETERMINATE and LATE FLOWERING are two TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS homologs that control two distinct phases of flowering initiation and development in pea. *Plant Cell* 15: 2742-2754.
 - 40 • **Friedland W. H. Barton A. (1975).** Destalking the wily tomato: a case study in social consequences in California agricultural research. *Research Monograph No. 15. Dept. of Applied Behavioral Sciences, University of California, Davis, California, USA.*
 - **Fu X. D. y Harberd N. P. (2003)** Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. 45 *Nature* 421: 740-743.
 - **Antoine L F Gady, Freddy W K Hermans, Marion H B J Van de Wal, Eibertus N van Loo, Richard G F Visser and Christian W B Bachem (2009).** Implementation of two high through-put techniques in a novel application: detecting point mutations in large EMS mutated plant populations. *Plant Methods* 5:13 doi: 10.1186/1746-4811-5-13.
 - 50 • **Guerineau F, Lucy A, Mullineaux P. (1992).** Effect of two consensus sequences preceding the translation initiator codon on gene expression in plant protoplasts. *Plant Mol Biol.* 18:815-8.
 - **Hanna G. C. Gentle A. Smith P. G. Lippe L. F. Davis G. N. McCoy D. N.(1964).** Recently developed vegetables aid mechanical cultivation. *California Agriculture* 18: 8-10.
 - 55 • **Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sato, Y., Ashikari, M. and Matsuoka, M. (2002).** The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell*, 14, 57-70.
 - 60 • **Cari M. Jones, Charles M. Rick, Dawn Adams, Judy Jernstedt and Roger T. Chetelat (2007).** Genealogy and fine mapping of *obscuravenosa*, a gene affecting the distribution of chloroplasts in leaf veins, and evidence of selection during breeding of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*, *Solanaceae*). *Am. J. Botany* 94: 935-947.
 - **Koornneef M. Elgersma A. Hanhart C. J. van Loenen-Martinez E. P. van Ring L. and Zeevaart J. A. D. (1985).** A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant* 65: 33-39.
 - 65 • **Krebs A. V. (2005).** *La Causa: the word was made flesh.* Website <http://www.farmworkermovement.orQ/essavs/essavs/KREBS%20MANUSCRIPT%20LA%20CAUSA.pdf>

- **Lee S. C. Cheng H. King K. E. Wang W. F. He Y. W. Hussain A. Lo J. Harberd N. P. y Peng, J. R. (2002)** Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev.* 16: 646-658.
- 5 • **Cristina Marti, Diego Orzáez, Philippe Ellul, Vicente Moreno, Juan Carbonell y Antonio Granell, (2007).** Silencing of DELLA induces facultative parthenocary in tomato fruits. *The Plant Journal* 52: 865-876.
- **McCallum C M, Comai L, Greene E A, Henikoff S:** Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics (2000). *Plant Physiol.* 123(2):439-442.
- 10 • **Menda N, Semel Y, Peled D, Eshed Y, Zamir D.(2004)** In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant J.* Jun; 38(5):861-72.
- **Murase K. Hirano Y. Sun t-P. y Hakoshima T. (2008).** Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456: 459-464.
- 15 • **Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee H S, Sun T P, Kamiya Y, Choi G. (2007)** PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds. *Plant Cell* 19: 1192-1208.
- 20 • **Peng J. and Harberd P. (1993).** Derivative alleles of the Arabidopsis gibberellin-insensitive (*gai*) mutación confer a wild-type phenotype. *Plant Cell.* 5: 351-360.
- **Peng J. Richard D. E. Hartley N. M. Murphy G. P. Devos K. M. Flitnham J. E. et al. (1999).** “Green Revolution” genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400: 256-261.
- 25 • **Peng J. R. Carol P. Richards D. E. King K. E. Cowling R. J. Murphy G. P. y Harberd N. P. (1997).** The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* 11: 3194-3205.
- 30 • **Pnueli L. Carmel-Goren L. Hareven D. Gutfinger T. Alvarez J. Ganai M. Zamir D. Lifschitz E. (1998).** The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development* 125: 1979-1989.
- 35 • **Pnueli L. Gutfinger T. Hareven D. Ben-Naim O. Ron N. Adir N. Lifschitz E. (2001).** Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell* 13: 2687-2702.
- **Qiu P. Shandilya H. D’Alessio J M. O’Connor K. Durocher J. Gerard G F. (2004)** Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques* 36(4):702-707.
- 40 • **Richards D. E., King K. E., Ait-ali T., y Nicholas P Harberd. (2001).** How gibberellin regulates plant growth and development: A Molecular Genetic Analysis of Gibberellin Signaling. *Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:67-88.
- 45 • **Roessner-Tunali U, Hegemann B, Lytovchenko A, Carrari F, Bruedigam C, Granot D and Fernie A R. (2003).** Metabolic Profiling of Transgenic Tomato Plants Overexpressing Hexokinase Reveals That the Influence of Hexose Phosphorylation Diminishes during Fruit Development. *Plant Physiology* 133:84-99.
- **Silverstone A. L. Ciampaglio Ch. N. Sun T.-p. (1998).** The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell*, 10: 155-169.
- 50 • **Silverstone, A. L., Jung, H-S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Sun, T-p. (2001).** Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell.* 13: 1555-1565.
- 55 • **Slade A J, Knauf V C:** TILLING moves beyond functional genomics into crop improvement. (2005). *Transgenic Res.* 14(2):109-115.
- **Smith B. (1998)** *Foreword, Livingston and the tomato.* Ohio State University Press, Columbus, Ohio, USA.
- 60 • **Stevens M. A. Rick C. M. (1986).** Genetics and breeding. In J. G. Atherton, J. Rudich [eds.] *The tomato crop: a scientific basis for improvement*, 35-105. Chapman and Hall, New York, New York, USA.
- **Szymkowiak E. J. Irish E. E. (2006).** *JOINTLESS* suppresses sympodial identity in inflorescence meristems of tomato. *Planta* 223: 646-658.
- 65 • **Till B J, Reynolds S H, Weil C, Springer N, Burtner C, Young K, Bowers E, Codorno C A, Enns L C, Odden A R. (2004).** Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biol* 4(1):12.

ES 2 364 932 A1

• **Triques K, Sturbois B, Gallais S, Dalmais M, Chauvin S, Clepet C, Aubourg S, Rameau C, Caboche M, Bendahmane A.** (2007). Characterization of *Arabidopsis thaliana* mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea. *Plant J.*, 51 (6): 1116-1125.

5 • **Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Motoyuki, A., and Matsuoka, M.** (2007). Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 183-198.

10 • **Ueguchi-Tanaka M. Hirano K. Hasegawa Y. Kitano H. y Matsuoka M.** (2008). Release of the repressive activity of rice DELLA proteína SLR1 by gibberellin does not require SLR1 degradation in the *gid2* mutant. *Plant Cell* 20: 2437-2446.

• **Wen C. K. y Chang C.** (2002) Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* 14: 87-100.

15 • **Wilson R. N. and Chris R. Somerville** (1995) Phenotypic Suppression of the Gibberellin-Insensitive Mutant (*gai*) of Arabidopsis. *Plant Physiol.* (1995) 108: 495-502.

• **Yeager A. F.** (1927). Determinate growth in the tomato. *Journal of Heredity* 28: 263-265.

20 • **Zanor M I, Rambla J L, Chaib J, Steppa A, Medina A, Granell A, Fernie AR, Causse M.,** (2009). Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. *Journal of Experimental Botany* 60: 2139-2154.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga **caracterizada** porque la alteración en la expresión de la proteína DELLA produce una inhibición en la represión del desarrollo y crecimiento de las plantas en comparación a plantas correspondientes no modificadas genéticamente.
- 10 2. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha alteración se obtiene mediante silenciamiento del gen SIDELLA u ortólogo.
- 15 3. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 2, **caracterizada** porque el silenciamiento se obtiene empleando una construcción génica que se basa en una copia antisentido del gen - SIDELLA controlada por el promotor 2XCaMV35S.
- 20 4. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha alteración se obtiene mediante mutación del gen SIDELLA u ortólogo.
- 25 5. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 4, **caracterizada** porque la mutación en la secuencia genética de SIDELLA se debe a adición y/o inserción y/o supresión y/o sustitución de uno o más nucleótidos de gen SIDELLA u ortólogo.
- 30 6. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 5, **caracterizada** porque la mutación consiste en la sustitución del nucleótido guanina por el nucleótido adenina en el nucleótido 458.
- 35 7. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 6, **caracterizada** porque la mutación en la secuencia genética de SIDELLA es la denominada TILLING 1 (SEQ ID No 3).
- 40 8. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 5, **caracterizada** porque la mutación consiste en la sustitución del nucleótido guanina por el nucleótido adenina en el nucleótido 1498.
- 45 9. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 8, **caracterizada** porque la mutación en la secuencia genética de SIDELLA es la denominada TILLING 2 (SEQ ID No.5).
- 50 10. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 5, **caracterizada** porque la mutación consiste en la sustitución del nucleótido citosina por timina en el nucleótido 994.
- 55 11. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 10, **caracterizada** porque la mutación en la secuencia genética de SIDELLA es la denominada TILLING 3 (SEQ ID No.7).
- 60 12. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 5, **caracterizada** porque la mutación consiste en la sustitución del nucleótido citosina por timina en el nucleótido 661.
- 65 13. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 12, **caracterizada** porque la mutación en la secuencia genética de SIDELLA es la denominada TILLING 4 (SEQ ID No.9).
14. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicaciones 1 a 13 **caracterizada** porque la planta exhibe un patrón de crecimiento simpodial.
15. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicaciones 1 a 14 **caracterizada** porque el patrón de crecimiento simpodial determinado se modifica a indeterminado.
16. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicaciones 1 a 14 **caracterizada** porque el patrón de crecimiento simpodial determinado se modifica a semideterminado.
17. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicaciones 1 a 13 **caracterizada** porque el contenido de metabolitos y/o algunas sustancias volátiles y/o no asociadas al aroma de los frutos se ve aumentado respecto a plantas correspondientes no modificadas genéticamente.

ES 2 364 932 A1

18. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicaciones 1 a 13 **caracterizada** porque el contenido de algunas sustancias volátiles asociadas y/o no asociadas al aroma de los frutos se ve reducido respecto a plantas correspondientes no modificadas genéticamente.

5 19. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 17 **caracterizada** porque el aumento en el contenido de los metabolitos sacarosa, tirosina, asparagina, isoleucina, treonina, prolina, ácido piroglutámico y mio-inositol es del orden del 100-400%, y/o el de fructosa y glucosa es del orden del 10-30%, y/o el de las sustancias volátiles asociadas al aroma de los frutos E-2-hexenal, 1-penten-3-ona y β .damascenona es del orden del 100-200%, y/o el de las sustancias volátiles no asociadas al aroma de los frutos ácido 3-metilbutanoico, E,E-2,4-decadienal y E-2-octenal es del orden del 100-200% respecto de plantas correspondientes no modificadas genéticamente.

15 20. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 18 **caracterizada** porque la disminución en el contenido de las sustancias volátiles asociadas al aroma de los frutos 3-metilbutanol, 1-nitro-2-feniletano, 2-feniletanol, fenilacetaldehído y 2-isobutiltiazol es del orden del 80-90%, y/o la de las sustancias volátiles no asociadas al aroma de los frutos geranilacetona, terpineol, linalool, bencil alcohol, eugenol, benzilnitrilo, 2-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol es del orden del 50-100% respecto de plantas correspondientes no modificadas genéticamente.

20 21. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicaciones 1 a 20 **caracterizada** porque la planta tiene un interés comercial y/o agrícola.

25 22. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 21 **caracterizada** porque dicha planta se selecciona del grupo de las solanáceas, cucurbitáceas, orquidáceas y/o leñosas.

23. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 22 **caracterizada** porque la planta pertenece a la familia de las Solanáceas.

30 24. Planta genéticamente modificada con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga según reivindicación 23 **caracterizada** porque la planta genéticamente modificada es una planta de tomate, *Solanum lycopersicum*.

35 25. Fruto de la planta genéticamente modificada según reivindicaciones 1 a 24 **caracterizado** porque el contenido de metabolitos y/o sustancias volátiles asociadas y/o no asociadas al aroma de los frutos está aumentado respecto a los frutos de plantas correspondientes no modificadas genéticamente.

40 26. Fruto de la planta genéticamente modificada según reivindicaciones 1 a 24 **caracterizado** porque el contenido de algunas sustancias volátiles asociadas y/o no asociadas al aroma de los frutos está reducido respecto a los frutos de plantas correspondientes no modificadas genéticamente.

45 27. Fruto de la planta genéticamente modificada según reivindicación 25 **caracterizado** porque aumento del contenido de metabolitos sacarosa, tirosina, asparagina, isoleucina, treonina, prolina, ácido piroglutámico y mio-inositol es del orden del 100-400%, y/o el de fructosa y glucosa es del orden del 10-30%, y/o el de las sustancias volátiles asociadas al aroma de los frutos E-2-hexenal, 1-penten-3-ona y β .damascenona es del orden del 100-200%, y/o el de las sustancias volátiles no asociadas al aroma de los frutos ácido 3-metilbutanoico, E,E-2,4-decadienal y E-2-octenal es del orden del 100-200% respecto a los frutos de plantas correspondientes no modificadas genéticamente.

50 28. Fruto de la planta genéticamente modificada según reivindicación 26 **caracterizado** porque la disminución de las sustancias volátiles asociadas al aroma de los frutos 3-metilbutanol, 1-nitro-2-feniletano, 2-feniletanol, fenilacetaldehído y 2-isobutiltiazol es del orden del 80-90%, y/o la de las sustancias volátiles no asociadas al aroma de los frutos geranilacetona, terpineol, linalool, bencil alcohol, eugenol, benzilnitrilo, 2-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol es del orden del 50-100% respecto a los frutos de plantas correspondientes no modificadas genéticamente.

55 29. Fruto según reivindicaciones 25-28 **caracterizado** porque el fruto es el tomate.

30. Semilla de la planta genéticamente modificada según reivindicaciones 1 a 29 **caracterizada** porque la expresión de la proteína DELLA se encuentra alterado.

60 31. Procedimiento de obtención de plantas genéticamente modificadas con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:

- a) transformar el genoma de una célula de la planta,
- b) regenerar la planta a partir de la célula de la etapa a),
- 65 c) obtener semillas de la planta transformada que contengan el genoma modificado y,

ES 2 364 932 A1

- d) crecer al menos una de las semillas de la etapa c) para obtener una planta que contenga la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga.

5 32. Procedimiento según reivindicación 31 **caracterizado** porque la etapa a) consiste en una mutagénesis dirigida.

33. Procedimiento según reivindicación 32 **caracterizado** porque la mutagénesis dirigida consiste en silenciar el gen SIDE LLA.

10 34. Procedimiento según reivindicación 33 **caracterizado** porque para el silenciamiento de la etapa a) se emplea la construcción génica asDELLA.

15 35. Procedimiento según reivindicación 34 **caracterizado** porque la construcción génica se basa en una copia antisentido del gen SIDE LLA controlada por el promotor 2XCaMV35S.

20 36. Procedimiento según reivindicación 32 **caracterizado** porque la mutagénesis dirigida de la etapa a) consiste en modificar la secuencia nativa del gen SIDE LLA a la secuencia del gen SIDE LLA mutado seleccionado del grupo de las mutaciones denominadas TILLING 1 (SEQ ID No 3), TILLING 2 (SEQ ID No 5), TILLING 3 (SEQ ID No 7), o TILLING 4 (SEQ ID No 9).

37. Procedimiento según reivindicación 31 **caracterizado** porque la etapa b) es opcional.

25 38. Procedimiento según reivindicación 37 **caracterizado** porque la etapa b) se realiza mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

39. Procedimiento según reivindicación 31 **caracterizado** porque la etapa a) consiste en una mutagénesis no dirigida que comprende las siguientes etapas:

- 30 i. exponer la planta a un agente mutagénico,
- 31 ii. extraer el DNA de cada una de las familias y combinar siguiendo una estrategia 3D,
- 32 iii. rastrear el gen SIDE LLA en cada familia mediante PCR anidada y cebadores específicos y universales,
- 35 iv. detectar los alelos mutantes de SIDE LLA por secuenciación y deconvolución.

40. Procedimiento según reivindicación 39 **caracterizado** porque el agente mutagénico de la etapa i) es etilmetanosulfonato.

41. Procedimiento según la reivindicación 39 **caracterizado** porque en la etapa (iv) se seleccionaron 4 formas alélicas de SIDE LLA.

45 42. Procedimiento según las reivindicaciones 39 a 41, **caracterizado** porque en la etapa (iv) una de las 4 formas alélicas de SIDE LLA es la denominada TILLING 1 (SEQ ID No.3).

43. Procedimiento según las reivindicaciones 39 a 41, **caracterizado** porque en la etapa (iv) una de las 4 formas alélicas de SIDE LLA es la denominada TILLING 2 (SEQ ID No.5).

50 44. Procedimiento según las reivindicaciones 39 a 41, **caracterizado** porque en la etapa (iv) una de las 4 formas alélicas de SIDE LLA es la denominada TILLING 3 (SEQ ID No.7).

55 45. Procedimiento según las reivindicaciones 39 a 41, **caracterizado** porque en la etapa (iv) una de las 4 formas alélicas de SIDE LLA es la denominada TILLING 4 (SEQ ID No.9).

60

65

FIG. 1



FIG. 2

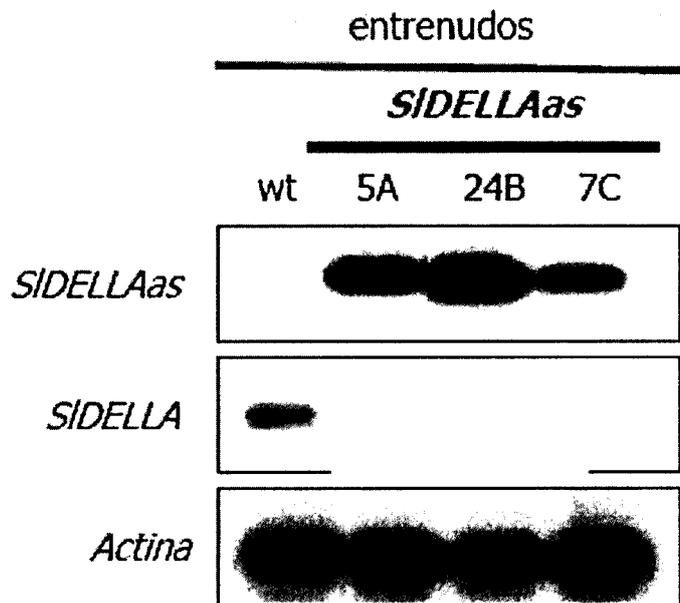
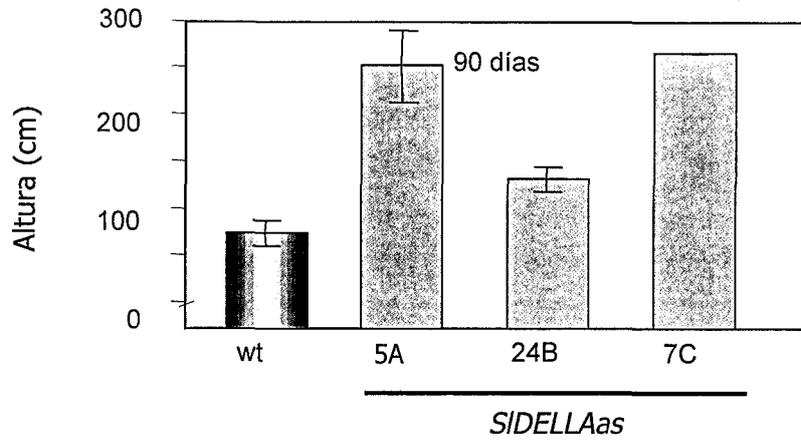


FIG. 3

A.



B.

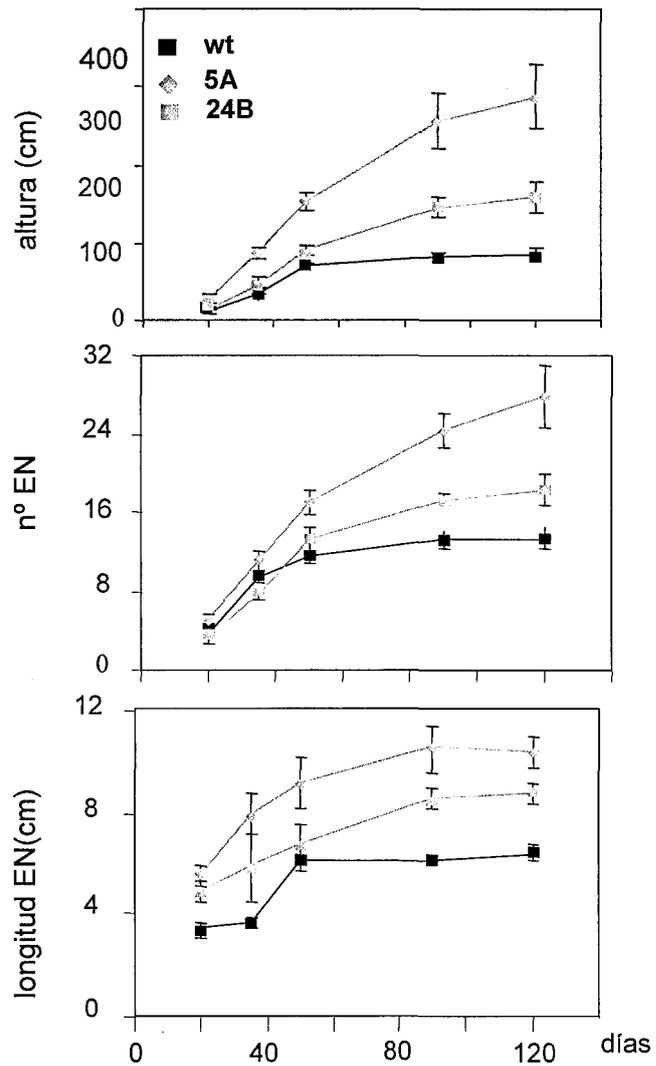


FIG. 4

A. TILLING 1 (SEQ ID No 5)

atgaagagagatcgagatcgagatcgagaaagagagaaaaagcattctctaattggtgctgtttcttcagggga
aaagtaagatttgggaagaagatgaagaagaaaaaccagatgctggaatggatgagcttttagctgttttggg
ttataaagtgaagtcgtctgatatggcggatgttgcataaaacttgaacagcttgagatggctatgggtaca
acgatggaagatggtattactcatctttctactgataccgttcataaaaaccatctgatatggctggttggg
taciaaagtatgttatcttcgatttcgacaaaactttgatatgtgtaatcaggaaaacgatgtgcttgtatctgg
ttgtggttcttcttctataatcgatttctcacaataatcatcgaacaagtaccatttctgatgatgattta
agagctatacctggtggtActgttttcaattcggatagtaataaaagacacagatcaacaacttctagttttt
caactacatcctcatctatggtgacagattcatcagcaacgagacctgttactagttgattcacaagaaac
tggggttctgtcttctcacttttaattggcgtgtgctgaagctgtacaacaagaaaatttaacttttagcggat
caacttgttagacatattggtattcttgcggtttcacaatctggtgctatgagaaaagttgctacttactttg
ctgaagcattagcaagaagaatctacaaaatttatccacaagattcaatggaatcatcatatacagatgtttt
acaaatgcatttctatgaaacttgccttatctcaaatctgctcaatttactgctaatacaagccattcttgaa
gcttttacaggttgtaacaaagttcatgtaattgattttagcttaaaacagggatgcaatggcctgcaactta
tgcaagcttttagctttacgccccggtggacctccggcatttagactcaccggaatcggacctccacagccgga
taacacaaatgccttgcaacaagttggatggaagttggctcagttagcggaaactattggggttgaatttgaa
ttcaggggatttgttgctaattcgttagcagatcttgatgcgactatacttgatataaggccaagtgaactg
aagcagtagctataaactctgtttttagcttcatcgattgttatcccggccgggagcaattgaaaaagttgt
gaactctattaacagattaacccgaagattgttactcttgttgagcaagaagcgaatcataacgcaggggtt
tttattgatagatttaacgaagctttgcattattactcaacctgtttgattcgttagaaagctctgggtctt
cgtcttcagcttcaccaactgggattcttctcaacctccggatgaacaatcaagatttgggtgatgtcggaggt
ttatttagggagacagatttgaacgtggtggcttgtgaaggttcagatcgagttgaacgacatgaaactg
aatcaatggaggggttaggatgaactcatctgggttcgatccggttcatctgggttcaaatgcgttcaacaag
cttccatgcttttagctctgttcgcccggcggcagatggttacaaggtggaagaaaacgatgggtgtcttatgtt
ggggtggcatacagggcacttatagctacctccgcttggagctattgcccgattccggcaccggcggcggga
gaagtcgagttgtaa

B. TILLING 1 (SEQ ID No. 6)

MKRDRDREREKKAFFSNGAVSSGKSKIWEDEEEKPDAGMDELLAVLGYKVKSSDMADVAQKLEQLEMAMGT
TMEDGITHLSTDTVHKNPSDMAGWVQSMSSISSTNFDMCNQENDVLVSGCGSSSSSIIDFSQNHRTSTISDDDL
RAIPGGTVFNSDSNKRHRSTTSSFSTTSSSMVTDSSATRPVVLVDSQETGVRLVHTLMACAEAVQOENLTLAD
QLVRHIGILAVSQSGAMRKVATYFAEALARRIYKIYPQDSMESSYTDVLQMHFYETCPYLKFAHFANQAILE
AFTGCNKVHVIDFSLKQGMQWPALMQALALRPGGPPAFRLTGIGPPQPDNTDALQQVQWKLQLAETIGVEFE
FRGFVANSLADLDATILDIRPSETEAVAINSVFELHRLLSRPGAIEKVLNSIKQINPKIVTLVEQEANHNAGV
FIDRFNEALHYSTMFDSLESSGSSSSASPTGILPQPPVNNQDLVMSEVYLGRQICNVVACEGSDRVERHETL
NQWRVRMNSSGFDPVHLGNSAFKQASMLLALFAGGDGYRVEENDGCLMLGWHTRPLIATSARKLLPDSGTGAG
EVEL

FIG. 5

A. TILLING 2 (SEQ ID No 7)

atgaagagagatcgagatcgagatcgagaaagagagaaaaaagcattctctaattggtgctgtttcttcagggg
 aaagtaagatttgggaagaagatgaagaagaaaaaccagatgctggaatggatgagcttttagctgttttggg
 ttataaagtgaagtcgtctgatatggcggatgttgctcaaaaacttgaacagcttgagatggctatgggtaca
 acgatggaagatggtattactcatctttctactgataccgttcataaaaacccatctgatatggctggttggg
 taaaaagtatggtatcttcgatttcgacaaaacttggatattgtgtaatcaggaaaacgatgtgcttgtatctgg
 ttgtggttcttcttcttctataatcgatttctcaciaaatcatcgaacaagtaccatttctgatgatgattta
 agagctataacctgggtggtgctgttttcaattcggatagtaataaaagacacagatcaacaacttctagttttt
 caactacatcctcatctatggtgacagattcatcagcaacgagacctgttgactagtgtgattcacaagaaac
 tgggggttcgtcttcttctcacttttaattggcgtgtgctgaagctgtacaacaagaaaatttaactttagcggat
 caacttgtagacatattggtattcttgcgggtttcacaatctggtgctatgagaaaagttgctacttactttg
 ctgaagcatttagcaagaagaatctcaaaaatttatccacaagattcaatggaatcatcatatacagatgtttt
 acaaatgcatttctatgaaacttgcctttatctcaaattcgtctatttactgctaatacaagccattcttgaa
 gcgtttacaggttgtaacaaagttcatgtaattgatttcagcttaaacagggtatgcaatggcctgcactta
 tgaagcttttagctttacgccccggtggacctccggcatttagactcaccggaatcggacctccacagccgga
 taacacagatgccttgcaacaagttggatggaagttggctcagttagcggaaactattgggggtgaaattgaa
 ttcaggggatttgttgctaattcgttagcagatcttgatgagactataacttgatataaggccaagtgaaactg
 aagcagtagctataaaactctgtttttgagcttcatcgattgttatcccggccgggagcaattgaaaaagtgtt
 gaactctattaacagattaaccggaagattgttactcttgttgagcaagaagcgaatcataacgcaggggtt
 tttattgatagatttaacgaagctttgcattattactcaaccatgtttgattcgttagaaagctctgggtctt
 cgtcttcagcttcaccaactgggattcttctcaacctccgggtgaacaatcaagatttggatgctcggagggt
 ttatttagggagacagatttgtaacgtggtggttgtAaaggttcagatcgagttgaacgacatgaaacactg
 aatcaatggaggggttaggatgaaactcatctgggttcgatccgggttcactctgggttcaaatgcgttcaaacaag
 ctccatgcttttagctctgttcgcccggcggcgatggttacagggtggaagaaaacgatgggtgtcttatggt
 ggggtggcatacacggccacttatagctacctccgctggaagctattgcccggactccggcaccggcggcggga
 gaagtcgagttgtaaactcgg

B. TILLING 2 (SEQ ID No 8)

MKRDRDRDREREKKAFFSNGAVSSGKSKIWEDEEEKPDAGMDELLAVLGYKVKSSDMADVAQKLEQLEMAMGT
 TMEDGITHLSTDTVHKNPSDMAGWVQSMSSISTNFDMCNQENDVLVSGCGSSSSIIDFSQNHRTSTISDDDL
 RAI PGGAVFNSDSNKRHRSTTSSFSTTSSSMVT DSSATRPVVLVDSQETGVRLVHTLMACAEAVQQENLTLAD
 QLVRHIGILAVSQSGAMRKVATYFAEALARRIYKIYPQDSMESSYTDVLQMHFYETCPYLKFAHFTANQAILE
 AFTGCNKVHVIDFSLKQGMQWPALMQALALRPGGPPAFRLTGIGPPQPDNTDALQQVQWKLQLAETIGVEFE
 FRGFVANSLADLDATILDIRPSETEAVAINSVFELHRLLSRPGAIEKVLNSIKQINPKIVTLVEQEANHNAGV
 FIDRFNEALHYSTMFDSLESSGSSSSASPTGILPQPPVNNQDLVMSEVYLGRQICNVVACKKGSDRVERHETL
 NQWRVRMNSSGFDPVHLGSAFKQASMLLALFAGGDGYRVEENDGCLMLGWHTRPLIATSARKLLPDSGTGAG
 EVEL

FIG. 6

A. TILLING 3 (SEQ ID No 9)

atgaagagagatcgagatcgagatcgagaaaagagagaaaaaagcattctctaattgggtgctgtttcttcagggga
aaagtaagatttgggaagaagatgaagaagaaaaaccagatgctggaatggatgagcttttagctgttttggg
ttataaagtgaagtcgtctgatatggcggatggtgctcaaaaacttgaacagcttgagatggctatgggtaca
acgatggaagatggtattactcatctttctactgataccgttcataaaaaccatctgatatggctgggtggg
taciaagtatggtatcttcgatttcgacaaaactttgatatgtgtaatcaggaaaacgatgtgcttgtatctgg
ttgtggttcttcttctctataatcgatttctcaciaaatcatcgaacaagtaccatttctgatgatgattta
agagctatacctgggtgggtgctgttttcaattcggatagtaataaaaagacacagatcaacaacttctagttttt
caactacatcctcatctatgggtgacagattcatcagcaacgagacctgttgactagtgtgattcacaagaaac
tggggttcgtcttcttctacttcaatggcgtgctgtaagctgtacaacaagaaaatctaacttttagcggat
caacttggtagacatattggatcttgcgggttcacaatctgggtgctatgagaaaagttgctacttactttg
ctgaagcattagcaagaagaatctcaaaaatctccacaagattcaatggaatcatcatatacagatgtttt
acaaatgcatttctatgaaacttgccttctcaaatcgtctcattttactgctaatacaagccattcttgaa
gctgttacaggttgtaacaaagttcatgtaattgatttcagcttaaacaggggatgcaatggcctgcactta
tgcaagctttagctttacgccccggtggacctccggcatttagaTtcaccggaatcggacctccacagccgga
taacacagatgccttgcaacaagttggatggaagttggctcagttagcggaaactattggggttgaatttgaa
ttcaggggatttgggtgtaattcgttagcagatcttgatgagactatacttgatataaggccaagtgaaactg
aagcagtagctataaactctgtttttagcctcatcgattgttatcccggccgggagcaattgaaaaagtggt
gaactctattaacagattaaccggaagattgttactcttggtagcaagaagcgaatcataacgcaggggtt
tttattgatagatttaacgaagcttgcattattactcaaccatgtttgattcgttagaaagctctgggtctt
cgtcttcagcttcaccaactgggattcttctcaacctccgggtgaacaatcaagatttgggtgatgtcggaggt
ttatttagggagacagatttgaactggtggtgcttgtgaaggttcagatcgagttgaaacgatgaaacactg
aatcaatggaggggttaggatgaactcatctgggttcgatccgggttcactctgggttcaaatgcgttcaacaag
cttccatgcttttagctctgttcgcccggcggcgatggttacaggggtggaagaaaacgatgggtgtcttatggt
ggggtggcatacacggcacttatagctacctccgectggaagctattgccggactccggcaccggcgccgga
gaagtcgagttgtaactcgg

B. TILLING 3 (SEQ ID No 10)

MKRDRDRDREREKKAFFSNGAVSSGKSKIWEDEEEKPDAGMDELLAVLGYKVKSSDMADVAQKLEQLEMAMGT
TMEDGITHLSTDTVHKNPSDMAGWVQSMSSISTNFDMCNQENDVLVSGCGSSSSSIDFSQNHRTSTISDDDL
RAIPGGAVFNSDSNKRHRSTSSSFSTSSSMVTDSSATRPVVLVDSQETGVRLVHTLMACAEAVQQENLTLAD
QLVRHIGILAVSQSGAMRKVATYFAEALARRIYKIYPQDSMESSYTDVLQMHFYETCPYLKFAHFTANQAI
AFTGCNKVHVIDFSLKQGMQWPALMQALALRPGGPPAFRFTGIGPPQPDNTDALQQVGWKLQLAETIGVEFE
FRGFVANSLADLDATILDIRPSETEAVAINSVFELHRLLSRPGAIEKVLNSIKQINPKIVTLVEQEANHNAGV
FIDRFNEALHYYSTMFDSLESSGSSSSASPTGILPQPPVNNQDLVMSEVYLGRQICNVVACEGSDRVERHETL
NQWRVRMNSSGFDPVHLGNSAFKQASMLLALFAGGDGYRVEENDGCLMLGWHTRPLIATSARKLLPDSGTGAG
EVEL

FIG. 7

A. TILLING 4 (SEQ ID No 13)

atgaagagagatcgagatcgagatcgagaaagagagaaaaaagcattctctaattgggtgctgtttcttcagggga
aaagtaagatttgggaagaagatgaagaagaaaaaccagatgctggaatggatgagcttttagctgttttggg
ttataaagtgaagtcgtctgatatggcggatggtgctcaaaaacttgaacagcttgagatggctatgggtaca
acgatggaagatgggtattactcatctttctactgataccggttcataaaaacccatctgatatggctgggtggg
tacaaagatggtatcttcgatttcgacaaaactttgatatgtgtaatcaggaaaacgatgtgcttgtatctgg
ttgtggttcttcttcttctataatcgattttctcaciaaatcatcgaacaagtaccatttctgatgatgattta
agagctatacctgggtgggtgctgttttcaattcggatagtaataaaagacacagatcaaTaacttctagttttt
caactacatcctcatctatgggtgacagattcatcagcaacgagacctgttgactagtgtgattcacaagaaaac
tggggttcgtcttgttcatactttaatggcgtgtgctgaagctgtacaacaagaaaatttaactttagcggat
caacttgtagacatattgggtattcttgcgggttcacaatctgggtgctatgagaaaagttgctacttactttg
ctgaagcatttagcaagaagaatctacaaaatttatccacaagattcaatggaatcatcatatacagatgtttt
acaaatgcatttctatgaaacttgcccttatctcaaattcgtctatttactgctaatacaagccattcttgaa
gcggttacaggttgtaacaaagttcatgtaattgatttcagcttaaaacaggggatgcaatggcctgcactta
tgcaagcttttagctttacgccccgggtggacctccggcatttagactcaccggaatcggacctccacagccgga
taacacagatgccttgcaacaagttggatggaagttggctcagttagcggaaactattgggggtgaaatttgaa
ttcaggggatttgttgctaattcgttagcagatcttgatgcgactataacttgatataaggccaagtgaaactg
aagcagtagctataaaactctgtttttgagcttcacgattgttatcccggccgggagcaattgaaaaagtgtt
gaactctattaacagattaaccgaagattgttactcttgttgagcaagaagcgaatcataacgcaggggtt
tttattgatagatttaacgaagctttgcattattactcaaccatgtttgattcgttagaaagctctgggtctt
cgtcttcagcttcaccaactgggattcttctcaacctccgggtgaacaatcaagatttgggtgatgtcggaggt
ttattaggggagacagatttgtaacgtgggtggcttgtgaagttcagatcgagttgaacgacatgaaactg
aatcaatggagggttaggatgaaactcatctgggttcgatccgggtcatctgggttcaaatgcgttcaaaacaag
cttccatgcttttagctctgttcgccggcggcgatggttacaggggtggaagaaaacgatgggtgtcttatgtt
gggggtggcatacacggccacttatagctacctccgctggaagctattgccggactccggcaccggcggccgga
gaagtcgagttgtaaactcgg

B. TILLING 4 (SEQ ID No 14)

MKRDRDRDREREKKAFFSNGAVSSGSKIWEDEEEKPDAGMDELLAVLGYKVKSSDMADVAQKLEQLEMAMGT
TMEDGITHLSTDTVHKNPDMAGWVQSMSSISTNFDMCNQENDVLVSGCGSSSSIIIDFSQNHRTSTISDDDL
RAIPGGAVFNSDSNKRHRSTTSSFSSTSSSMVTDSSATRPVVLVDSQETGVRLVHTLMACAEAVQQENLTLAD
QFVRHIGILAVSQSGAMRKVATYFAEALARRIYKIYPQDSMESSYTDVLQMHFYETCPYLKFAHFTANQAILE
AFTGCNKVHVIDFSLKQGMQWPALMQALALRPGPPAFRLTGIGPPQPDNTDALQQVGWKLQAETIGVEFE
FRGFVANSLADLDATILDIRPSETEAVAINSVFELHRLLSRPGAIEKVLNSIKQINPKIVTLVEQEANHNAGV
FIDRFNEALHYSTMFDSLESSGSSSSASPTGILPQPPVNNQDLVMSEVYLGRQICNVVACEGSDRVERHETL
NQWRVRMNSSGFDPVHLGSAFKQASMLLALFAGGDGYRVEENDGCLMLGWHTRPLIATSAWKLLPDSGTGAG
EVEL

FIG. 9 Mutante TILLING 2 G / 1498 / A Glu (E) / 500 / Lys(K)

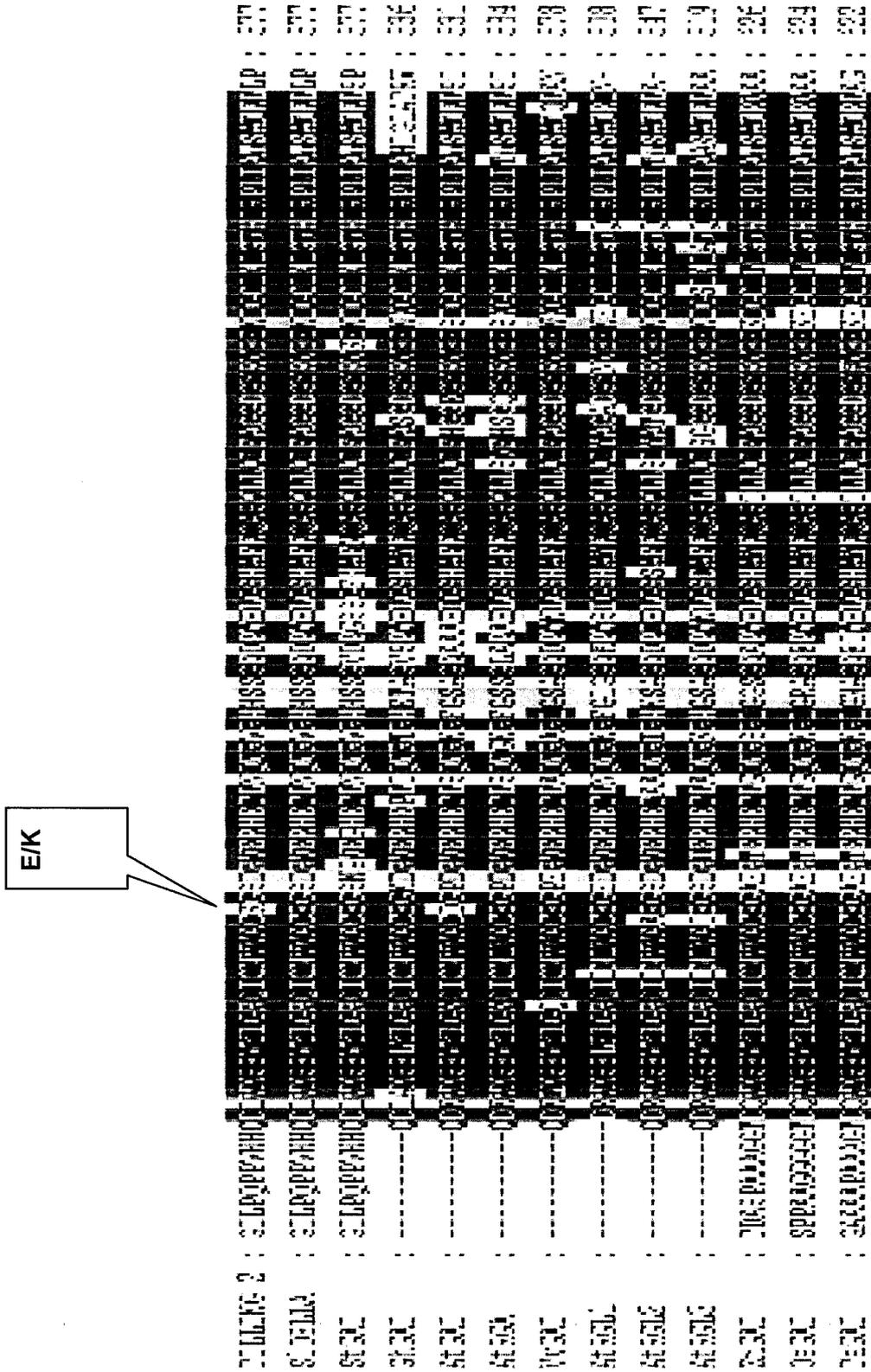


FIG. 11 Mutante TILLING 4 C / 661 / T Leu (L) / 221 / Phe(F)

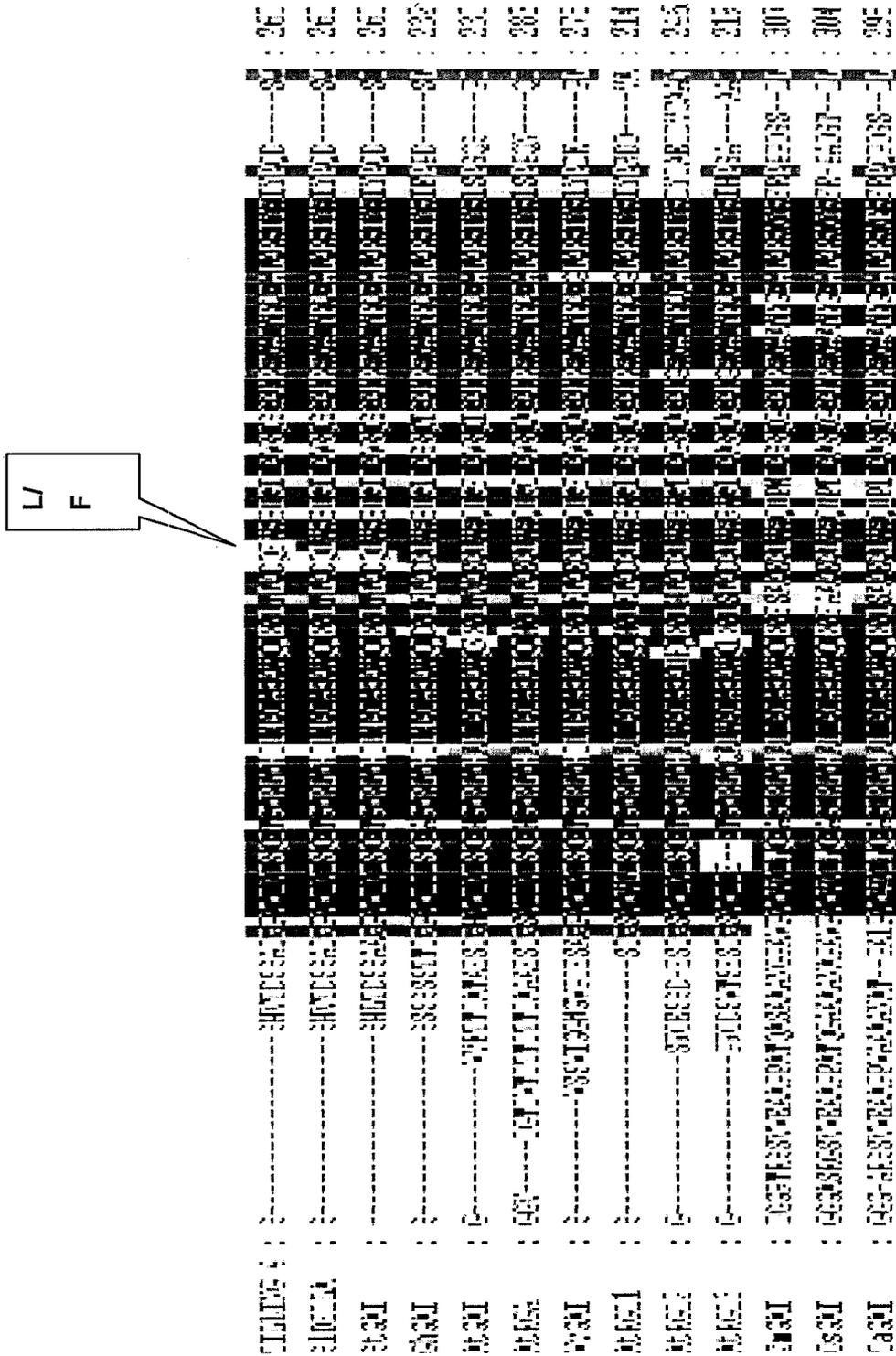


FIG. 12



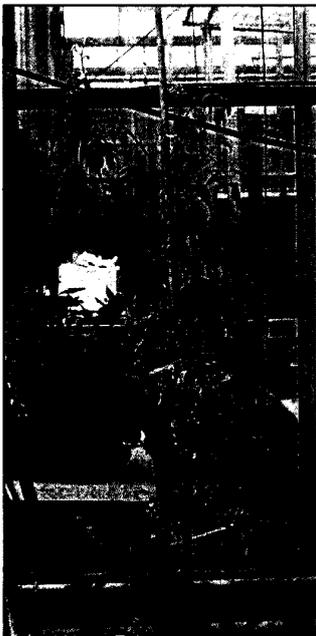
wt M82



TILLING 1-5-Homoz



TILLING 2-1-Heteroz



TILLING 3-2-Homoz



TILLING 3-3-Homoz



TILLING 4-2-Homoz

ES 2 364 932 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Politécnica de Valencia y Consejo Superior de Investigaciones Científicas

5 <120> ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DELLA U ORTÓLOGA PARA PARA ALTE-
RAR EL PATRÓN DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS Y EL CONTENIDO DE METABOLITOS DEL
FRUTO

10 <130> Gen SIDEELLA

<160> 28

15 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1767

20 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

25 <223> SIDEELLA Rutgers

<400> 1

30	atgaagagag atcgagatcg agatcgagaa agagagaaaa aagcattctc taatggtgct	60
	gtttcttcag ggaaaagtaa gatttgggaa gaagatgaag aagaaaaacc agatgctgga	120
	atggatgagc ttttagctgt tttgggttat aaagtgaagt cgtctgatat ggcggatggt	180
35	gctcaaaaac ttgaacagct tgagatggct atgggtacaa cgatggaaga tgggtattact	240
	catctttcta ctgataccgt tcataaaaac ccatctgata tggctgggtg ggtacaaagt	300
	atgttatctt cgatttcgac aaactttgat atgtgtaate aggaaaacga tgtgcttgta	360
40	tctggttgtg gttcttcttc ttctataate gatttctcac aaaatcatcg aacaagtacc	420
	atctctgatg atgatttaag agctatacct ggtggtgctg ttttcaatto ggatagtaat	480
	aaaagacaca gatcaacaac ttctagtttt tcaactacat cctcatctat ggtgacagat	540
45	tcatcagcaa cgagacctgt tgtactagtt gattcacaag aaactggggt tegtcttggt	600
	catactttaa tggcgtgtgc tgaagctgta caacaagaaa atttaacttt agcggatcaa	660
	cttgttagac atattggtat tcttgcggtt tcacaatctg gtgctatgag aaaagttgct	720
50	acttactttg ctgaagcatt agcaagaaga atctacaaaa tttatccaca agattcaatg	780
	gaatcatcat atacagatgt ttacaaaatg catttctatg aaacttgccc ttatctcaaa	840
	ttcgtcaat ttactgctaa tcaagccatt cttgaagcgt ttacagggtg taacaaagtt	900
55	catgtaattg atttcagctt aaaacaggggt atgcaatggc ctgcacttat gcaagcttta	960
	gctttacgcc ccggtggacc tccggcattt agactcaccg gaatcggacc tccacagccg	1020
	gataacacaa atgccttgca acaagttgga tgggaagttgg ctcagttagc ggaaactatt	1080
60	ggggttgaat ttgaattcag gggatttggt gctaattcgt tagcagatct tgatgogact	1140
	atacttgata taaggccaag tgaaactgaa gcagtagcta taaactctgt ttttgagctt	1200
65	catcgattgt tatcccggcc gggagcaatt gaaaaagtgt tgaactctat taaacagatt	1260

ES 2 364 932 A1

	Asp 145	Leu	Arg	Ala	Ile	Pro 150	Gly	Gly	Ala	Val	Phe 155	Asn	Ser	Asp	Ser	Asn 160
5	Lys	Arg	His	Arg	Ser 165	Thr	Thr	Ser	Ser	Phe 170	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser 175
10	Met	Val	Thr	Asp 180	Ser	Ser	Ala	Thr	Arg 185	Pro	Val	Val	Leu	Val 190	Asp	Ser
15	Gln	Glu	Thr 195	Gly	Val	Arg	Leu	Val 200	His	Thr	Leu	Met	Ala 205	Cys	Ala	Glu
20	Ala	Val 210	Gln	Gln	Glu	Asn	Leu 215	Thr	Leu	Ala	Asp	Gln 220	Leu	Val	Arg	His
25	Ile 225	Gly	Ile	Leu	Ala	Val 230	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala 235	Met	Arg	Lys	Val	Ala 240
30	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu 245	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg 250	Ile	Tyr	Lys	Ile	Tyr 255	Pro
35	Gln	Asp	Ser	Met 260	Glu	Ser	Ser	Tyr	Thr 265	Asp	Val	Leu	Gln	Met 270	His	Phe
40	Tyr	Glu	Thr 275	Cys	Pro	Tyr	Leu	Lys 280	Phe	Ala	Gln	Phe	Thr 285	Ala	Asn	Gln
45	Ala	Ile 290	Leu	Glu	Ala	Phe	Thr 295	Gly	Cys	Asn	Lys	Val 300	His	Val	Ile	Asp
50	Phe 305	Ser	Leu	Lys	Gln	Gly 310	Met	Gln	Trp	Pro	Ala 315	Leu	Met	Gln	Ala	Leu 320
55	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly 325	Gly	Pro	Pro	Ala	Phe 330	Arg	Leu	Thr	Gly	Ile 335	Gly
60	Pro	Pro	Gln	Pro 340	Asp	Asn	Thr	Asn	Ala 345	Leu	Gln	Gln	Val	Gly 350	Trp	Lys
65	Leu	Ala	Gln 355	Leu	Ala	Glu	Thr	Ile 360	Gly	Val	Glu	Phe	Glu 365	Phe	Arg	Gly
70	Phe	Val 370	Ala	Asn	Ser	Leu	Ala 375	Asp	Leu	Asp	Ala	Thr 380	Ile	Leu	Asp	Ile
75	Arg 385	Pro	Ser	Glu	Thr	Glu 390	Ala	Val	Ala	Ile	Asn 395	Ser	Val	Phe	Glu	Leu 400

ES 2 364 932 A1

	gctcaaaaac ttgaacagct tgagatggct atgggtacaa cgatggaaga tggattact	240
	catctttcta ctgataccgt tcataaaaac ccatctgata tggctggttg ggtacaaagt	300
5	atgttatctt cgatttcgac aaactttgat atgtgtaatc aggaaaacga tgtgcttgta	360
	tctggttgtg gttcttcttc ttctataatc gatttctcac aaaatcatcg aacaagtacc	420
10	atctctgatg atgatttaag agctatacct ggtgggtactg ttttcaattc ggatagtaat	480
	aaaagacaca gatcaacaac ttctagtttt tcaactacat cctcatctat ggtgacagat	540
	tcatcagcaa cgagacctgt tgtactagtt gattcacaag aaactggggg tCGTcttgtt	600
15	catactttaa tggcgtgtgc tgaagctgta caacaagaaa atttaacttt agcggatcaa	660
	cttgttagac atattgggat tcttgcggtt tcacaatctg gtgctatgag aaaagttgct	720
20	acttactttg ctgaagcatt agcaagaaga atctacaaaa tttatccaca agattcaatg	780
	gaatcatcat atacagatgt tttaaaaatg ctttctatg aaacttgccc ttatctcaaa	840
	ttcgtcfaat ttactgctaa tcaagccatt cttgaagcgt ttacaggttg taacaaagtt	900
25	catgtaattg atttcagctt aaaacagggg atgcaatggc ctgcacttat gcaagcttta	960
	gctttacgcc ccggtggacc tccggcattt agactcaccg gaatcggacc tccacagccg	1020
30	gataacacaa atgccttgca acaagttgga tggaaagttgg ctCagttagc ggaaactatt	1080
	ggggttgaat ttgaattcag gggatttggt gctaattcgt tagcagatct tgatgcgact	1140
	atacttgata taaggccaag tgaaaactgaa gcagtagcta taaactctgt ttttgagctt	1200
35	catcgattgt tatcccggcc gggagcaatt gaaaaagtgt tgaactctat taacagatt	1260
	aaccgaaga ttgttactct tgttgagcaa gaagcgaatc ataacgcagg ggTTTTtatt	1320
40	gatagattta acgaagcttt gcattattac tcaacatgt ttgattcgtt agaaagctct	1380
	gggtcttcgt cttcagcttc accaactggg attcttctc aacctccggg gaacaatcaa	1440
45	gatttgggtga tgtcggaggt ttatttaggg agacagattt gtaacgtggg ggcttgtaa	1500
	ggttcagatc gagttgaacg acatgaaaca ctgaatcaat ggagggttag gatgaactca	1560
	tctgggttcg atccggttca tctgggttca aatgcgttca aacaagcttc catgctttta	1620
50	gctctgttcg ccggcggcga tggttacaag gtggaagaaa acgatgggtg tcttatgttg	1680
	gggtggcata cacggccact tatagctacc tccgcttgga agctattgcc ggattccggc	1740
55	accggcggcg gagaagtcga gttgtaa	1767

<210> 4

<211> 588

60 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

65 <223> Mutante TILLING 1

ES 2 364 932 A1

<400> 4

5	Met 1	Lys	Arg	Asp	Arg 5	Asp	Arg	Asp	Arg	Glu 10	Arg	Glu	Lys	Lys	Ala 15	Phe
10	Ser	Asn	Gly	Ala 20	Val	Ser	Ser	Gly	Lys 25	Ser	Lys	Ile	Trp	Glu 30	Glu	Asp
15	Glu	Glu	Gly 35	Lys	Pro	Asp	Ala	Gly 40	Met	Asp	Glu	Leu	Leu 45	Ala	Val	Leu
20	Gly	Tyr 50	Lys	Val	Lys	Ser	Ser 55	Asp	Met	Ala	Asp	Val 60	Ala	Gln	Lys	Leu
25	Glu 65	Gln	Leu	Glu	Met	Ala 70	Met	Gly	Thr	Thr	Met 75	Glu	Asp	Gly	Ile	Thr 80
30	His	Leu	Ser	Thr	Asp 85	Thr	Val	His	Lys	Asn 90	Pro	Ser	Asp	Met	Ala 95	Gly
35	Trp	Val	Gln	Ser 100	Met	Leu	Ser	Ser	Ile 105	Ser	Thr	Asn	Phe	Asp 110	Met	Cys
40	Asn	Gln	Glu 115	Asn	Asp	Val	Leu	Val 120	Ser	Gly	Cys	Gly	Ser 125	Ser	Ser	Ser
45	Ile 130	Ile	Asp	Phe	Ser	Gln	Asn 135	His	Arg	Thr	Ser	Thr 140	Ile	Ser	Asp	Asp
50	Asp 145	Leu	Arg	Ala	Ile	Pro 150	Gly	Gly	Thr	Val	Phe 155	Asn	Ser	Asp	Ser	Asn 160
55	Lys	Arg	His	Arg	Ser 165	Thr	Thr	Ser	Ser	Phe 170	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser 175	Ser
60	Met	Val	Thr	Asp 180	Ser	Ser	Ala	Thr	Arg 185	Pro	Val	Val	Leu	Val 190	Asp	Ser
65	Gln	Glu	Thr 195	Gly	Val	Arg	Leu	Val 200	His	Thr	Leu	Met	Ala 205	Cys	Ala	Glu
70	Ala	Val 210	Gln	Gln	Glu	Asn	Leu 215	Thr	Leu	Ala	Asp	Gln 220	Leu	Val	Arg	His
75	Ile 225	Gly	Ile	Leu	Ala	Val 230	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala 235	Met	Arg	Lys	Val	Ala 240
80	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu 245	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg 250	Ile	Tyr	Lys	Ile	Tyr 255	Pro

ES 2 364 932 A1

Gln Asp Ser Met Glu Ser Ser Tyr Thr Asp Val Leu Gln Met His Phe
 260 265 270

5

Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala Asn Gln
 275 280 285

10

Ala Ile Leu Glu Ala Phe Thr Gly Cys Asn Lys Val His Val Ile Asp
 290 295 300

15

Phe Ser Leu Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu Met Gln Ala Leu
 305 310 315 320

20

Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ala Phe Arg Leu Thr Gly Ile Gly
 325 330 335

25

Pro Pro Gln Pro Asp Asn Thr Asp Ala Leu Gln Gln Val Gly Trp Lys
 340 345 350

30

Leu Ala Gln Leu Ala Glu Thr Ile Gly Val Glu Phe Glu Phe Arg Gly
 355 360 365

35

Phe Val Ala Asn Ser Leu Ala Asp Leu Asp Ala Thr Ile Leu Asp Ile
 370 375 380

40

Arg Pro Ser Glu Thr Glu Ala Val Ala Ile Asn Ser Val Phe Glu Leu
 385 390 395 400

45

His Arg Leu Leu Ser Arg Pro Gly Ala Ile Glu Lys Val Leu Asn Ser
 405 410 415

50

Ile Lys Gln Ile Asn Pro Lys Ile Val Thr Leu Val Glu Gln Glu Ala
 420 425 430

55

Asn His Asn Ala Gly Val Phe Ile Asp Arg Phe Asn Glu Ala Leu His
 435 440 445

60

Tyr Tyr Ser Thr Met Phe Asp Ser Leu Glu Ser Ser Gly Ser Ser Ser
 450 455 460

65

Ser Ala Ser Pro Thr Gly Ile Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Asn Gln
 465 470 475 480

Asp Leu Val Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val
 485 490 495

Val Ala Cys Glu Gly Ser Asp Arg Val Glu Arg His Glu Thr Leu Asn
 500 505 510

Gln Trp Arg Val Arg Met Asn Ser Ser Gly Phe Asp Pro Val His Leu

ES 2 364 932 A1

	515		520		525	
5	Gly Ser	Asn Ala Phe Lys	Gln Ala Ser Met Leu	Leu Ala Leu Phe Ala		
	530		535		540	
10	Gly Gly Asp Gly Tyr Arg Val Glu Glu Asn Asp Gly Cys Leu Met Leu					
	545	550	555	560		
15	Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Lys Leu Leu					
		565	570	575		
20	Pro Asp Ser Gly Thr Gly Ala Gly Glu Val Glu Leu					
		580	585			
	<210> 5					
	<211> 1773					
	<212> DNA					
	<213> Artificial					
	<220>					
	<223> Mutante TILLING 2					
25	<400> 5					
30	atgaagagag atcgagatcg agatcgagaa agagagaaaa aagcattctc taatgggtgct					60
	gtttcttcag ggaaaagtaa gatttgggaa gaagatgaag aagaaaaacc agatgctgga					120
	atggatgagc ttttagctgt tttgggttat aaagtgaagt cgtctgatat ggcggatggt					180
35	gctcaaaaac ttgaacagct tgagatggct atgggtacaa cgatggaaga tgggtattact					240
	catctttcta ctgataccgt tcataaaaac ccatctgata tggctggttg ggtacaaagt					300
40	atgttatctt cgatttcgac aaactttgat atgtgtaatc aggaaaacga tgtgcttgta					360
	tctggttgtg gttcttcttc ttctataatc gatttctcac aaaatcatcg aacaagtacc					420
	atctctgatg atgatttaag agctatacct ggtggtgctg ttttcaattc ggatagtaat					480
45	aaaagacaca gatcaacaac ttctagtttt tcaactacat cctcatctat ggtgacagat					540
	tcatcagcaa cgagacctgt tgtactagtt gattcacaag aaactggggt tcgtcttggt					600
50	catactttaa tggcgtgtgc tgaagctgta caacaagaaa atttaacttt agcggatcaa					660
	cttgttagac atattggtat tcttgcggtt tcacaatctg gtgctatgag aaaagttgct					720
	acttactttg ctgaagcatt agcaagaaga atctacaaaa tttatccaca agattcaatg					780
55	gaatcatcat atacagatgt ttacaaaatg catttctatg aaacttgccc ttatctcaaa					840
	ttcgctcatt ttactgctaa tcaagccatt cttgaagcgt ttacaggttg taacaaagtt					900
60	catgtaattg atttcagctt aaaacagggg atgcaatggc ctgcacttat gcaagcttta					960
	gctttacgcc ccggtggacc tcoggcattt agactcaccg gaatcggacc tccacagccc					1020
	gataacacag atgccttgca acaagttgga tgggaagttgg ctcagttagc ggaaactatt					1080
65	ggggttgaat ttgaattcag gggatttggt gctaattcgt tagcagatct tgatgcgact					1140

ES 2 364 932 A1

```

atacttgata taaggccaag tgaaactgaa gcagtagcta taaactctgt ttttgagctt 1200
catcgattgt tatccccggcc, gggagcaatt gaaaaagtgt tgaactctat taaacagatt 1260
5 aaccogaaga ttgttactct tgttgagcaa gaagcgaatc ataacgcagg ggtttttatt 1320
gatagattta acgaagcttt gcattattac tcaacatgt ttgattcgtt agaaagctct 1380
10 gggctctcgt cttcagcttc accaactggg attcttcctc aacctccggt gaacaatcaa 1440
gatttggtga tgtcggaggt ttatttaggg agacagattt gtaacgtggt ggcttgtaaa 1500
ggttcagatc gagttgaacg acatgaaaca ctgaatcaat ggagggttag gatgaactca 1560
15 tctggggttc atccgggttc tctggggttc aatgcggttc aacaagcttc catgctttta 1620
gctctgttcg ccggcggcga tggttacagg gtggaagaaa acgatgggtg tcttatgttg 1680
20 ggggtggcata cacggccact tatagctacc tccgcctgga agctattgcc ggactccggc 1740
accggcgccg gagaagtcga gttgtaaact cgg 1773

```

```

25 <210> 6
    <211> 588
    <212> PRT
    <213> Artificial
30
    <220>
    <223> Mutante TILLING 2
35 <400> 6

```

```

Met Lys Arg Asp Arg Asp Arg Asp Arg Glu Arg Glu Lys Lys Ala Phe
1          5          10
40
Ser Asn Gly Ala Val Ser Ser Gly Lys Ser Lys Ile Trp Glu Glu Asp
20          25          30
45
Glu Glu Glu Lys Pro Asp Ala Gly Met Asp Glu Leu Leu Ala Val Leu
35          40          45
50
Gly Tyr Lys Val Lys Ser Ser Asp Met Ala Asp Val Ala Gln Lys Leu
50          55          60
55
Glu Gln Leu Glu Met Ala Met Gly Thr Thr Met Glu Asp Gly Ile Thr
65          70          75          80
60
His Leu Ser Thr Asp Thr Val His Lys Asn Pro Ser Asp Met Ala Gly
85          90          95
65
Trp Val Gln Ser Met Leu Ser Ser Ile Ser Thr Asn Phe Asp Met Cys
100          105          110
70
Asn Gln Glu Asn Asp Val Leu Val Ser Gly Cys Gly Ser Ser Ser Ser
115          120          125

```

ES 2 364 932 A1

	Ile	Ile	Asp	Phe	Ser	Gln	Asn	His	Arg	Thr	Ser	Thr	Ile	Ser	Asp	Asp
	130						135					140				
5	Asp	Leu	Arg	Ala	Ile	Pro	Gly	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Ser	Asp	Ser	Asn
	145					150					155					160
10	Lys	Arg	His	Arg	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser
					165					170					175	
15	Met	Val	Thr	Asp	Ser	Ser	Ala	Thr	Arg	Pro	Val	Val	Leu	Val	Asp	Ser
				180					185					190		
20	Gln	Glu	Thr	Gly	Val	Arg	Leu	Val	His	Thr	Leu	Met	Ala	Cys	Ala	Glu
			195					200					205			
25	Ala	Val	Gln	Gln	Glu	Asn	Leu	Thr	Leu	Ala	Asp	Gln	Leu	Val	Arg	His
	210						215					220				
30	Ile	Gly	Ile	Leu	Ala	Val	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala	Met	Arg	Lys	Val	Ala
	225					230					235					240
35	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Ile	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Pro
					245					250					255	
40	Gln	Asp	Ser	Met	Glu	Ser	Ser	Tyr	Thr	Asp	Val	Leu	Gln	Met	His	Phe
				260					265					270		
45	Tyr	Glu	Thr	Cys	Pro	Tyr	Leu	Lys	Phe	Ala	His	Phe	Thr	Ala	Asn	Gln
			275					280					285			
50	Ala	Ile	Leu	Glu	Ala	Phe	Thr	Gly	Cys	Asn	Lys	Val	His	Val	Ile	Asp
	290						295					300				
55	Phe	Ser	Leu	Lys	Gln	Gly	Met	Gln	Trp	Pro	Ala	Leu	Met	Gln	Ala	Leu
	305					310					315					320
60	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Ala	Phe	Arg	Leu	Thr	Gly	Ile	Gly
					325					330					335	
65	Pro	Pro	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Gly	Trp	Lys
				340					345					350		
70	Leu	Ala	Gln	Leu	Ala	Glu	Thr	Ile	Gly	Val	Glu	Phe	Glu	Phe	Arg	Gly
			355					360					365			
75	Phe	Val	Ala	Asn	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Asp	Ala	Thr	Ile	Leu	Asp	Ile
		370					375					380				

ES 2 364 932 A1

	Arg	Pro	Ser	Glu	Thr	Glu	Ala	Val	Ala	Ile	Asn	Ser	Val	Phe	Glu	Leu
	385					390					395					400
5	His	Arg	Leu	Leu	Ser	Arg	Pro	Gly	Ala	Ile	Glu	Lys	Val	Leu	Asn	Ser
					405					410					415	
10	Ile	Lys	Gln	Ile	Asn	Pro	Lys	Ile	Val	Thr	Leu	Val	Glu	Gln	Glu	Ala
				420					425					430		
15	Asn	His	Asn	Ala	Gly	Val	Phe	Ile	Asp	Arg	Phe	Asn	Glu	Ala	Leu	His
			435					440					445			
20	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Met	Phe	Asp	Ser	Leu	Glu	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser
	450						455					460				
25	Ser	Ala	Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Val	Asn	Asn	Gln
	465					470					475					480
30	Asp	Leu	Val	Met	Ser	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gln	Ile	Cys	Asn	Val
				485						490					495	
35	Val	Ala	Cys	Lys	Gly	Ser	Asp	Arg	Val	Glu	Arg	His	Glu	Thr	Leu	Asn
				500					505					510		
40	Gln	Trp	Arg	Val	Arg	Met	Asn	Ser	Ser	Gly	Phe	Asp	Pro	Val	His	Leu
			515					520					525			
45	Gly	Ser	Asn	Ala	Phe	Lys	Gln	Ala	Ser	Met	Leu	Leu	Ala	Leu	Phe	Ala
		530					535					540				
50	Gly	Gly	Asp	Gly	Tyr	Arg	Val	Glu	Glu	Asn	Asp	Gly	Cys	Leu	Met	Leu
	545					550					555					560
55	Gly	Trp	His	Thr	Arg	Pro	Leu	Ile	Ala	Thr	Ser	Ala	Trp	Lys	Leu	Leu
				565						570					575	
60	Pro	Asp	Ser	Gly	Thr	Gly	Ala	Gly	Glu	Val	Glu	Leu				
				580					585							
65	<210> 7 <211> 1773 <212> DNA <213> Artificial <220> <223> Mutante TILLING 3 <400> 7															
66	atgaagagag atcgagatcg agatcgagaa agagagaaaa aagcattctc taatggtgct 60 gtttcttcag ggaaaagtaa gatttgggaa gaagatgaag aagaaaaacc agatgctgga 120															

ES 2 364 932 A1

	atggatgagc ttttagctgt tttgggttat aaagtgaagt cgtctgatat ggcggatggt	180
	gctcaaaaac ttgaacagct tgagatggct atgggtacaa cgatggaaga tggattact	240
5	catctttcta ctgataccgt tcataaaaac ccatctgata tggctgggtg ggtacaaaagt	300
	atgttatctt cgatttcgac aaactttgat atgtgtaatc aggaaaacga tgtgcttgta	360
10	tctggttgtg gttcttcttc ttctataatc gattttctcac aaaatcatcg aacaagtacc	420
	atctctgatg atgatttaag agctatacct ggtgggtgctg ttttcaattc ggatagtaat	480
	aaaagacaca gatcaacaac ttctagtttt tcaactacat cctcatctat ggtgacagat	540
15	tcatacagcaa cgagacctgt tgtactagtt gattcacaag aaactggggg tctgcttggt	600
	catactttaa tggcgtgtgc tgaagctgta caacaagaaa atttaacttt agcggatcaa	660
20	cttgttagac atattggtat tcttgcggtt tcacaatctg gtgctatgag aaaagttgct	720
	acttactttg ctgaagcatt agcaagaaga atctacaaaa tttatccaca agattcaatg	780
	gaatcatcat atacagatgt tttacaaatg catttctatg aaacttgccc ttatctcaaa	840
25	ttcgctcatt ttactgctaa tcaagccatt cttgaagcgt ttacaggttg taacaaagtt	900
	catgtaattg atttcagctt aaaacagggg atgcaatggc ctgcacttat gcaagcttta	960
30	gctttacgcc ccggtggacc tccggcattt agattcaccg gaatcggacc tccacagccg	1020
	gataacacag atgccttgca acaagttgga tgggaagttgg ctcagttagc ggaaactatt	1080
	ggggttgaat ttgaattcag gggatttggt gctaattcgt tagcagatct tgatgcgact	1140
35	atacttgata taaggccaag tgaactgaa gcagtagcta taaactctgt ttttgagctt	1200
	catcgattgt tatcccggcc gggagcaatt gaaaaagtgt tgaactctat taaacagatt	1260
40	aaccgaaga ttgttactct tgttgagcaa gaagcgaatc ataacgcagg ggtttttatt	1320
	gatagattta acgaagcttt gcattattac tcaacctatg ttgattcgtt agaaagctct	1380
45	gggtcttcgt cttcagcttc accaactggg attcttctc aacctccggg gaacaatcaa	1440
	gatttggtga tgtcggaggt ttatthaggg agacagattt gtaacgtggg ggcttggtgaa	1500
	ggttcagatc gagttgaacg acatgaaaca ctgaatcaat ggagggttag gatgaaactca	1560
50	tctgggttcg atccggttca tctgggttca aatgcgttca aacaagcttc catgctttta	1620
	gctctgttcg ccggcgccga tggttacagg gtggaagaaa acgatgggtg tcttatgttg	1680
55	gggtggcata cacggccact tatagctacc tccgcctgga agctattgcc ggactccggc	1740
	accggcgccg gagaagtcca gttgtaaact cgg	1773

60 <210> 8

<211> 588

<212> PRT

<213> Artificial

65

<220>

<223> Mutante TILLING 3

ES 2 364 932 A1

<400> 8

5	Met 1	Lys	Arg	Asp	Arg 5	Asp	Arg	Asp	Arg	Glu 10	Arg	Glu	Lys	Lys	Ala 15	Phe
10	Ser	Asn	Gly	Ala 20	Val	Ser	Ser	Gly	Lys 25	Ser	Lys	Ile	Trp	Glu 30	Glu	Asp
15	Glu	Glu	Glu 35	Lys	Pro	Asp	Ala	Gly 40	Met	Asp	Glu	Leu	Leu 45	Ala	Val	Leu
20	Gly	Tyr 50	Lys	Val	Lys	Ser	Ser 55	Asp	Met	Ala	Asp	Val 60	Ala	Gln	Lys	Leu
25	Glu 65	Gln	Leu	Glu	Met 70	Ala	Met	Gly	Thr	Thr 75	Met	Glu	Asp	Gly	Ile	Thr 80
30	His	Leu	Ser	Thr 85	Asp	Thr	Val	His	Lys	Asn 90	Pro	Ser	Asp	Met	Ala 95	Gly
35	Trp	Val	Gln	Ser 100	Met	Leu	Ser	Ser	Ile 105	Ser	Thr	Asn	Phe	Asp 110	Met	Cys
40	Asn	Gln	Glu 115	Asn	Asp	Val	Leu	Val 120	Ser	Gly	Cys	Gly	Ser 125	Ser	Ser	Ser
45	Ile 130	Ile	Asp	Phe	Ser	Gln	Asn 135	His	Arg	Thr	Ser	Thr 140	Ile	Ser	Asp	Asp
50	Asp 145	Leu	Arg	Ala	Ile 150	Pro	Gly	Gly	Ala	Val	Phe 155	Asn	Ser	Asp	Ser	Asn 160
55	Lys	Arg	His	Arg 165	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Phe 170	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser 175
60	Met	Val	Thr	Asp 180	Ser	Ser	Ala	Thr	Arg 185	Pro	Val	Val	Leu	Val 190	Asp	Ser
65	Gln	Glu	Thr 195	Gly	Val	Arg	Leu	Val 200	His	Thr	Leu	Met	Ala 205	Cys	Ala	Glu
70	Ala 210	Val	Gln	Gln	Glu	Asn	Leu 215	Thr	Leu	Ala	Asp	Gln 220	Leu	Val	Arg	His
75	Ile 225	Gly	Ile	Leu	Ala	Val 230	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala 235	Met	Arg	Lys	Val	Ala 240
80	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu 245	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg 250	Ile	Tyr	Lys	Ile	Tyr 255	Pro

ES 2 364 932 A1

	Gln	Asp	Ser	Met	Glu	Ser	Ser	Tyr	Thr	Asp	Val	Leu	Gln	Met	His	Phe	
				260					265					270			
5	Tyr	Glu	Thr	Cys	Pro	Tyr	Leu	Lys	Phe	Ala	His	Phe	Thr	Ala	Asn	Gln	
			275					280					285				
10	Ala	Ile	Leu	Glu	Ala	Phe	Thr	Gly	Cys	Asn	Lys	Val	His	Val	Ile	Asp	
		290					295					300					
15	Phe	Ser	Leu	Lys	Gln	Gly	Met	Gln	Trp	Pro	Ala	Leu	Met	Gln	Ala	Leu	
	305					310					315					320	
20	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Ala	Phe	Arg	Phe	Thr	Gly	Ile	Gly	
					325					330					335		
25	Pro	Pro	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Gly	Trp	Lys	
				340					345					350			
30	Leu	Ala	Gln	Leu	Ala	Glu	Thr	Ile	Gly	Val	Glu	Phe	Glu	Phe	Arg	Gly	
			355					360					365				
35	Phe	Val	Ala	Asn	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Asp	Ala	Thr	Ile	Leu	Asp	Ile	
		370					375					380					
40	Arg	Pro	Ser	Glu	Thr	Glu	Ala	Val	Ala	Ile	Asn	Ser	Val	Phe	Glu	Leu	
	385					390					395					400	
45	His	Arg	Leu	Leu	Ser	Arg	Pro	Gly	Ala	Ile	Glu	Lys	Val	Leu	Asn	Ser	
					405					410					415		
50	Ile	Lys	Gln	Ile	Asn	Pro	Lys	Ile	Val	Thr	Leu	Val	Glu	Gln	Glu	Ala	
				420					425					430			
55	Asn	His	Asn	Ala	Gly	Val	Phe	Ile	Asp	Arg	Phe	Asn	Glu	Ala	Leu	His	
			435					440					445				
60	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Met	Phe	Asp	Ser	Leu	Glu	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	
		450					455						460				
65	Ser	Ala	Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Val	Asn	Asn	Gln	
	465					470					475					480	
70	Asp	Leu	Val	Met	Ser	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gln	Ile	Cys	Asn	Val	
					485					490					495		
75	Val	Ala	Cys	Glu	Gly	Ser	Asp	Arg	Val	Glu	Arg	His	Glu	Thr	Leu	Asn	
			500						505					510			

ES 2 364 932 A1

gataacacag atgccttgca acaagttgga tggagttgg ctcagttagc ggaaactatt 1080
 ggggttgaat ttgaattcag gggatttggt gctaattcgt tagcagatct tgatgcgact 1140
 5 atacttgata taaggccaag tgaactgaa gcagtagcta taaactctgt ttttgagctt 1200
 catcgattgt tatcccggcc gggagcaatt gaaaaagtgt tgaactctat taaacagatt 1260
 10 aaccggaaga ttgttactct tgttgagcaa gaagcgaatc ataacgcagg ggtttttatt 1320
 gatagattta acgaagcttt gcattattac tcaacatgt ttgattcgtt agaaagctct 1380
 gggctctcgt cttcagcttc accaactggg attcttctc aacctccggg gaacaatcaa 1440
 15 gatttgggtga tgtcggaggt ttatntaggg agacagattt gtaacgtggg ggcttgtgaa 1500
 ggttcagatc gagttgaacg acatgaaaca ctgaatcaat ggagggttag gatgaactca 1560
 20 tctgggttcg atccggttca tctgggttca aatgcgttca aacaagcttc catgctttta 1620
 gctctgttcg ccggcggcga tggttacagg gtggaagaaa acgatgggtg tcttatgttg 1680
 gggtggcata cacggccact tatagctacc tccgcctgga agctattgcc ggactccggc 1740
 25 accggcgccg gagaagtcga gttgtaaact cgg 1773

<210> 10

30 <211> 588

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Mutante TILLING 4

<400> 10

40 Met Lys Arg Asp Arg Asp Arg Asp Arg Glu Arg Glu Lys Lys Ala Phe
 1 5 10 15
 45 Ser Asn Gly Ala Val Ser Ser Gly Lys Ser Lys Ile Trp Glu Glu Asp
 20 25 30
 50 Glu Glu Glu Lys Pro Asp Ala Gly Met Asp Glu Leu Leu Ala Val Leu
 35 40 45
 55 Gly Tyr Lys Val Lys Ser Ser Asp Met Ala Asp Val Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 60 Glu Gln Leu Glu Met Ala Met Gly Thr Thr Met Glu Asp Gly Ile Thr
 65 70 75 80
 65 His Leu Ser Thr Asp Thr Val His Lys Asn Pro Ser Asp Met Ala Gly
 85 90 95
 Trp Val Gln Ser Met Leu Ser Ser Ile Ser Thr Asn Phe Asp Met Cys
 100 105 110

ES 2 364 932 A1

	Asn	Gln	Glu	Asn	Asp	Val	Leu	Val	Ser	Gly	Cys	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	115 120 125
5	Ile	Ile	Asp	Phe	Ser	Gln	Asn	His	Arg	Thr	Ser	Thr	Ile	Ser	Asp	Asp	130 135 140
10	Asp	Leu	Arg	Ala	Ile	Pro	Gly	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Ser	Asp	Ser	Asn	145 150 155 160
15	Lys	Arg	His	Arg	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser	165 170 175
20	Met	Val	Thr	Asp	Ser	Ser	Ala	Thr	Arg	Pro	Val	Val	Leu	Val	Asp	Ser	180 185 190
25	Gln	Glu	Thr	Gly	Val	Arg	Leu	Val	His	Thr	Leu	Met	Ala	Cys	Ala	Glu	195 200 205
30	Ala	Val	Gln	Gln	Glu	Asn	Leu	Thr	Leu	Ala	Asp	Gln	Phe	Val	Arg	His	210 215 220
35	Ile	Gly	Ile	Leu	Ala	Val	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala	Met	Arg	Lys	Val	Ala	225 230 235 240
40	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Ile	Tyr	Lys	Ile	Tyr	Pro	245 250 255
45	Gln	Asp	Ser	Met	Glu	Ser	Ser	Tyr	Thr	Asp	Val	Leu	Gln	Met	His	Phe	260 265 270
50	Tyr	Glu	Thr	Cys	Pro	Tyr	Leu	Lys	Phe	Ala	His	Phe	Thr	Ala	Asn	Gln	275 280 285
55	Ala	Ile	Leu	Glu	Ala	Phe	Thr	Gly	Cys	Asn	Lys	Val	His	Val	Ile	Asp	290 295 300
60	Phe	Ser	Leu	Lys	Gln	Gly	Met	Gln	Trp	Pro	Ala	Leu	Met	Gln	Ala	Leu	305 310 315 320
65	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Ala	Phe	Arg	Leu	Thr	Gly	Ile	Gly	325 330 335
70	Pro	Pro	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Gly	Trp	Lys	340 345 350
75	Leu	Ala	Gln	Leu	Ala	Glu	Thr	Ile	Gly	Val	Glu	Phe	Glu	Phe	Arg	Gly	355 360 365
80	Phe	Val	Ala	Asn	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Asp	Ala	Thr	Ile	Leu	Asp	Ile	

ES 2 364 932 A1

	370		375		380											
5	Arg 385	Pro	Ser	Glu	Thr	Glu 390	Ala	Val	Ala	Ile	Asn 395	Ser	Val	Phe	Glu	Leu 400
10	His	Arg	Leu	Leu	Ser 405	Arg	Pro	Gly	Ala	Ile 410	Glu	Lys	Val	Leu	Asn 415	Ser
15	Ile	Lys	Gln	Ile 420	Asn	Pro	Lys	Ile	Val 425	Thr	Leu	Val	Glu	Gln 430	Glu	Ala
20	Asn	His	Asn 435	Ala	Gly	Val	Phe	Ile 440	Asp	Arg	Phe	Asn	Glu 445	Ala	Leu	His
25	Tyr	Tyr 450	Ser	Thr	Met	Phe	Asp 455	Ser	Leu	Glu	Ser	Ser 460	Gly	Ser	Ser	Ser
30	Ser 465	Ala	Ser	Pro	Thr	Gly 470	Ile	Leu	Pro	Gln	Pro 475	Pro	Val	Asn	Asn	Gln 480
35	Asp	Leu	Val	Met	Ser 485	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly 490	Arg	Gln	Ile	Cys	Asn 495	Val
40	Val	Ala	Cys	Glu 500	Gly	Ser	Asp	Arg	Val 505	Glu	Arg	His	Glu	Thr 510	Leu	Asn
45	Gln	Trp	Arg 515	Val	Arg	Met	Asn	Ser 520	Ser	Gly	Phe	Asp	Pro 525	Val	His	Leu
50	Gly	Ser 530	Asn	Ala	Phe	Lys	Gln 535	Ala	Ser	Met	Leu	Leu 540	Ala	Leu	Phe	Ala
55	Gly 545	Gly	Asp	Gly	Tyr	Arg 550	Val	Glu	Glu	Asn	Asp 555	Gly	Cys	Leu	Met	Leu 560
60	Gly	Trp	His	Thr	Arg 565	Pro	Leu	Ile	Ala	Thr 570	Ser	Ala	Trp	Lys	Leu 575	Leu
65	Pro	Asp	Ser	Gly 580	Thr	Gly	Ala	Gly	Glu 585	Val	Glu	Leu				

<210> 11

<211> 1767

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SIDELLA M82 Det

ES 2 364 932 A1

<400> 11

	atgaagagag atcgagatcg agatcgagaa agagagaaaa aagcattctc taatgggtgct	60
5	gtttcttcag ggaaaagtaa gatttgggaa gaagatgaag aagaaaaacc agatgctgga	120
	atggatgagc ttttagctgt tttgggttat aaagtgaagt cgtctgatat ggcggtatgt	180
	gctcaaaaac ttgaacagct tgagatggct atgggtacaa cgatggaaga tggattact	240
10	catctttcta ctgataccgt tcataaaaac ccatctgata tggctgggtg ggtacaaagt	300
	atgttatctt cgatttcgac aaactttgat atgtgtaatc aggaaaacga tgtgcttgta	360
15	tctgggtgtg gttcttcttc ttctataatc gattttctcac aaaatcatcg aacaagtacc	420
	atctctgatg atgatttaag agctatacct ggtgggtgctg ttttcaattc ggatagtaat	480
	aaaagacaca gatcaacaac ttctagtttt tcaactacat cctcatctat ggtgacagat	540
20	tcatcagcaa cgagacctgt tgtactagtt gattcacaag aaactggggg tctgcttggt	600
	catactttaa tggcgtgtgc tgaagctgta caacaagaaa atttaacttt agcggatcaa	660
25	cttgtagac atattggtat tcttgcggtt tcacaatctg gtgctatgag aaaagttgct	720
	acttactttg ctgaagcatt agcaagaaga atctacaaaa tttatccaca agattcaatg	780
30	gaatcatcat atacagatgt ttacaaaatg catttctatg aaacttgccc ttatctcaaa	840
	ttcgctcatt ttactgctaa tcaagccatt cttgaagcgt ttacagggtg taacaaagtt	900
	catgtaattg atttcagctt aaaacagggg atgcaatggc ctgcacttat gcaagcttta	960
35	gctttacgcc ccggtggacc tccggcattt agactcaccg gaatcggacc tccacagccg	1020
	gataacacag atgccttgca acaagttgga tgggaagttgg ctcagttagc ggaaactatt	1080
40	ggggttgaat ttgaattcag gggatttggt gctaattcgt tagcagatct tgatgcgact	1140
	atacttgata taaggccaag tgaactgaa gcagtagcta taaactctgt ttttgagctt	1200
	catcgattgt tatcccggcc gggagcaatt gaaaaagtgt tgaactctat taaacagatt	1260
45	aaccgaaga ttgttactct tgttgagcaa gaagcgaatc ataacgcagg ggtttttatt	1320
	gatagattta acgaagcttt gcattattac tcaacctatg ttgattcgtt agaaagctct	1380
50	gggtcttcgt cttcagcttc accaactggg attcttctctc aacctccggt gaacaatcaa	1440
	gatttgggtg tgtcggaggt ttatttaggg agacagattt gtaacgtggg ggcttgtgaa	1500
55	ggttcagatc gagttgaacg acatgaaaca ctgaatcaat ggaggggttag gatgaactca	1560
	tctgggttcg atccggttca tctgggttca aatgcgttca aacaagcttc catgctttta	1620
	gctctgttcg ccggcgccga tggttacagg gtggaagaaa acgatgggtg tcttatggtg	1680
60	gggtggcata cacggccact tatagctacc tccgctgga agctattgcc ggactccggc	1740
	accggcgccg gagaagtcga gttgtaa	1767

65 <210> 12
 <211> 588
 <212> PRT

ES 2 364 932 A1

<213> Artificial

<220>

5 <223> SIDECLA M82 Det

<400> 12

10	Met 1	Lys	Arg	Asp	Arg 5	Asp	Arg	Asp	Arg	Glu 10	Arg	Glu	Lys	Lys	Ala 15	Phe
15	Ser	Asn	Gly	Ala 20	Val	Ser	Ser	Gly	Lys 25	Ser	Lys	Ile	Trp	Glu 30	Glu	Asp
20	Glu	Glu	Glu 35	Lys	Pro	Asp	Ala	Gly 40	Met	Asp	Glu	Leu	Leu 45	Ala	Val	Leu
25	Gly	Tyr 50	Lys	Val	Lys	Ser	Ser 55	Asp	Met	Ala	Asp	Val 60	Ala	Gln	Lys	Leu
30	Glu 65	Gln	Leu	Glu	Met	Ala 70	Met	Gly	Thr	Thr	Met 75	Glu	Asp	Gly	Ile	Thr 80
35	His	Leu	Ser	Thr	Asp 85	Thr	Val	His	Lys	Asn 90	Pro	Ser	Asp	Met	Ala 95	Gly
40	Trp	Val	Gln	Ser 100	Met	Leu	Ser	Ser	Ile 105	Ser	Thr	Asn	Phe	Asp 110	Met	Cys
45	Asn	Gln	Glu 115	Asn	Asp	Val	Leu	Val 120	Ser	Gly	Cys	Gly	Ser 125	Ser	Ser	Ser
50	Ile 130	Ile	Asp	Phe	Ser	Gln	Asn 135	His	Arg	Thr	Ser	Thr 140	Ile	Ser	Asp	Asp
55	Asp 145	Leu	Arg	Ala	Ile	Pro 150	Gly	Gly	Ala	Val	Phe 155	Asn	Ser	Asp	Ser	Asn 160
60	Lys	Arg	His	Arg	Ser 165	Thr	Thr	Ser	Ser	Phe 170	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser 175	Ser
65	Met	Val	Thr	Asp 180	Ser	Ser	Ala	Thr	Arg 185	Pro	Val	Val	Leu	Val 190	Asp	Ser
70	Gln	Glu	Thr 195	Gly	Val	Arg	Leu	Val 200	His	Thr	Leu	Met	Ala 205	Cys	Ala	Glu
75	Ala	Val 210	Gln	Gln	Glu	Asn	Leu	Thr 215	Leu	Ala	Asp	Gln 220	Leu	Val	Arg	His
80	Ile 225	Gly	Ile	Leu	Ala	Val 230	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala 235	Met	Arg	Lys	Val	Ala 240

ES 2 364 932 A1

	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu 245	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg 250	Ile	Tyr	Lys	Ile	Tyr 255	Pro
5	Gln	Asp	Ser	Met 260	Glu	Ser	Ser	Tyr	Thr 265	Asp	Val	Leu	Gln	Met 270	His	Phe
10	Tyr	Glu	Thr 275	Cys	Pro	Tyr	Leu	Lys 280	Phe	Ala	His	Phe	Thr 285	Ala	Asn	Gln
15	Ala	Ile 290	Leu	Glu	Ala	Phe	Thr 295	Gly	Cys	Asn	Lys	Val 300	His	Val	Ile	Asp
20	Phe 305	Ser	Leu	Lys	Gln	Gly 310	Met	Gln	Trp	Pro	Ala 315	Leu	Met	Gln	Ala	Leu 320
25	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly 325	Gly	Pro	Pro	Ala	Phe 330	Arg	Leu	Thr	Gly	Ile 335	Gly
30	Pro	Pro	Gln	Pro 340	Asp	Asn	Thr	Asp	Ala 345	Leu	Gln	Gln	Val	Gly 350	Trp	Lys
35	Leu	Ala	Gln 355	Leu	Ala	Glu	Thr	Ile 360	Gly	Val	Glu	Phe	Glu 365	Phe	Arg	Gly
40	Phe 370	Val	Ala	Asn	Ser	Leu	Ala 375	Asp	Leu	Asp	Ala	Thr 380	Ile	Leu	Asp	Ile
45	Arg 385	Pro	Ser	Glu	Thr	Glu 390	Ala	Val	Ala	Ile	Asn 395	Ser	Val	Phe	Glu	Leu 400
50	His	Arg	Leu	Leu	Ser 405	Arg	Pro	Gly	Ala	Ile 410	Glu	Lys	Val	Leu	Asn 415	Ser
55	Ile	Lys	Gln	Ile 420	Asn	Pro	Lys	Ile	Val 425	Thr	Leu	Val	Glu	Gln 430	Glu	Ala
60	Asn	His	Asn 435	Ala	Gly	Val	Phe	Ile 440	Asp	Arg	Phe	Asn	Glu 445	Ala	Leu	His
65	Tyr	Tyr 450	Ser	Thr	Met	Phe	Asp 455	Ser	Leu	Glu	Ser	Ser 460	Gly	Ser	Ser	Ser
70	Ser 465	Ala	Ser	Pro	Thr	Gly 470	Ile	Leu	Pro	Gln	Pro 475	Pro	Val	Asn	Asn	Gln 480
75	Asp	Leu	Val	Met 485	Ser	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly 490	Arg	Gln	Ile	Cys	Asn 495	Val

ES 2 364 932 A1

	Val	Ala	Cys	Glu	Gly	Ser	Asp	Arg	Val	Glu	Arg	His	Glu	Thr	Leu	Asn
				500					505					510		
5	Gln	Trp	Arg	Val	Arg	Met	Asn	Ser	Ser	Gly	Phe	Asp	Pro	Val	His	Leu
			515					520					525			
10	Gly	Ser	Asn	Ala	Phe	Lys	Gln	Ala	Ser	Met	Leu	Leu	Ala	Leu	Phe	Ala
		530					535					540				
15	Gly	Gly	Asp	Gly	Tyr	Arg	Val	Glu	Glu	Asn	Asp	Gly	Cys	Leu	Met	Leu
	545					550					555					560
20	Gly	Trp	His	Thr	Arg	Pro	Leu	Ile	Ala	Thr	Ser	Ala	Trp	Lys	Leu	Leu
				565						570					575	
25	Pro	Asp	Ser	Gly	Thr	Gly	Ala	Gly	Glu	Val	Glu	Leu				
			580						585							
30	<210> 13															
	<211> 21															
	<212> DNA															
	<213> Artificial															
35	<220>															
	<223> oligonucleótidos TGxC7															
	<400> 13															
40	ccagcacttg tcattcttac c															21
	<210> 14															
	<211> 22															
45	<212> DNA															
	<213> Artificial															
	<220>															
50	<223> oligonucleótidos TGxC8															
	<400> 14															
55	catctctctc attgtctctt cc															22
	<210> 15															
	<211> 26															
60	<212> DNA															
	<213> Artificial															
	<220>															
65	<223> oligonucleótido SIDEELLA-ext-F1															

ES 2 364 932 A1

	<400> 15	
	cattctctaa tgggctggtt ttcttc	26
5	<210> 16	
	<211> 25	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido SIDEELLA-ext-R1	
15	<400> 16	
	aggtagctat aagtgccgt gtatg	25
20	<210> 17	
	<211> 25	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido SIDEELLA-F1	
30	<400> 17	
	ggaaaagtaa gatttgggaa gaaga	25
35	<210> 18	
	<211> 25	
	<212> DNA	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido SIDEELLA-R1	
45	<400> 18	
	ctaaaagcat ggaagcttgt ttgaa	25
50	<210> 19	
	<211> 19	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebadores M13F700	
60	<400> 19	
	cacgacgttg taaaacgac	19
65	<210> 20	
	<211> 20	

ES 2 364 932 A1

<212> DNA

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cebador M13R800

<400> 20

10

ggataacaat ttcacacagg

20

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200902130

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.11.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/82** (2006.01)
A01H5/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BASSEL GW., et al. Procera is a putative DELLA mutant in tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>): effects on the seed and vegetative plant. 2008. <i>Journal of Experimental Botany</i> . Vol. 59, No. 3, páginas 585-593. Páginas 585-588.	1,4,5,21-24,30
X	DAVIERE J-M., et al. Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function.2008. <i>Current Opinion in Genetics & Development</i> . Vol.18, páginas 295-303. Página 295.	1,21,30
X	IZQUIERDO RM. Ingeniería genética y transferencia génica. Ediciones Pirámide 2001. Páginas 164-166,298.	31,37-40
Y		32-35
Y	MARTÍ C., et al. Silencing of DELLA induces facultative parthenocarp in tomato fruits. 2007. <i>The Plant Journal</i> . Vol. 52, páginas 865-876. Página 867.	32-35

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
01.09.2011

Examinador
I. Rueda Molins

Página
1/5

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)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.09.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

Reivindicaciones 2, 3, 6-20, 25-29, 31- 45

SI

Reivindicaciones 1, 4, 5, 21-24, 30

NO**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones 2, 3, 6-20, 25-29, 36, 41-45

SI

Reivindicaciones 1, 4, 5, 21-24, 30-35, 37-40

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 se publica.

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	BASSEL GW., et al. Procera is a putative DELLA mutant in tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>): effects on the seed and vegetative plant. <i>Journal of Experimental Botany</i> . Vol. 59, No. 3, páginas 585-593. Páginas 585-588.	2008
D02	DAVIERE J-M., et al. Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. <i>Current Opinion in Genetics & Development</i> . Vol. 18, páginas 295-303. Página 295.	2008
D03	IZQUIERDO RM. Ingeniería genética y transferencia génica. Ediciones Pirámide. Páginas 164-166,298.	2001
D04	MARTÍ C., et al. Silencing of DELLA induces facultative parthenocarp in tomato fruits. <i>The Plant Journal</i> . Vol. 52, páginas 865-876. Página 867.	2007

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

En las reivindicaciones 1 y 21 de la solicitud se reivindica una planta genéticamente modificada, con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga caracterizada porque la alteración en la expresión de la proteína DELLA produce una inhibición en la represión del desarrollo y crecimiento de las plantas, en comparación con las plantas correspondientes no modificadas genéticamente. En la reivindicación 30 se reivindica la semilla obtenida de dicha planta.

En las reivindicaciones 4, 5 y 22-24 de la solicitud (que son reivindicaciones dependientes de la reivindicación 1) se reivindica que, la alteración reivindicada en la reivindicación 1 sea una mutación, como puede ser la originada por una sustitución y que la planta genéticamente modificada sea *Solanum lycopersicum*.

En las reivindicaciones 31, 37 y 38 de la solicitud se reivindica un procedimiento de obtención de plantas genéticamente modificadas, con la expresión alterada de la proteína DELLA u ortóloga, que comprende una etapa de transformación del genoma, la regeneración de la planta y su posterior crecimiento. En las reivindicaciones 39 y 40 (que son reivindicaciones dependientes de la reivindicación 31) se reivindica que la realización de la etapa de transformación se realice mediante mutagénesis no dirigida empleando etilmetanosulfonato como agente mutágeno.

En las reivindicaciones 32-35 (reivindicaciones dependientes de la reivindicación 31) de la solicitud se reivindica como la etapa de transformación del genoma se basa en el silenciamiento del gen DELLA, con una construcción génica determinada controlada por el promotor 2XCaMV35S.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6 y 8 LP11/1986)

El documento D01 muestra (en las páginas 585-588) como una mutación en la proteína DELLA originada por una sustitución aminoacídica provoca cambios en la estructura y desarrollo de una planta de *Solanum lycopersicum*. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D01, las reivindicaciones 1, 4, 5, 21-24, 30 no presentan novedad ni actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.

El documento D02 refleja (en la página 295) que la proteína DELLA es un represor del crecimiento de las plantas. Así, el hecho de que la alteración (mediante cualquier metodología empleada en ingeniería genética: adiciones, sustituciones, supresiones...) de dicha proteína produzca una inhibición en la represión del desarrollo de las plantas resultaría evidente para un experto en la materia a partir de la información divulgada en el citado documento. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D02, las reivindicaciones 1, 21 y 30 presentan novedad, pero no actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.

El documento D03 muestra (en la figura de la página 298) un esquema de transformación general de una planta mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Dicho esquema general es el que se encuentra reivindicado en las reivindicaciones 31, 37 y 38 de la solicitud. Por otro lado, en las páginas 164-166 del documento D03 se divulga la mutagénesis al azar como un método habitual de transformación genómica. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D03 y que el agente etilmetanosulfonato es un mutágeno ampliamente conocido en el estado de la técnica se puede afirmar que, las reivindicaciones 31 y 37-40 presentan novedad pero no actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.

El documento D04 refleja (en la página 867) una construcción genética determinada, que emplea el gen SIDELLA controlado por el promotor 2XCaMV35S. Tanto la construcción divulgada en el documento D04, como el promotor empleado coinciden con el que se menciona en las reivindicaciones 32-35. Así, resultaría evidente para un experto en la materia el empleo de la construcción divulgada en el documento D04 para llevar a cabo la transformación genética de una planta siguiendo un protocolo general de transformación, como el que refleja el documento D03. Por lo que, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D03 y D04 las reivindicaciones 32-35 presentan novedad pero no actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.