

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 822**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2007 E 07802565 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2190999**

54 Título: **Secuencia promotora y construcción génica para aumentar el rendimiento de cosechas en tomates**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.06.2013

73 Titular/es:

**ENZA ZADEN BEHEER B.V. (100.0%)
HALING 1E
1602 DB ENKHUIZEN, NL**

72 Inventor/es:

**HELDENS, JOZEF WILHELMUS GERARDUS;
YKEMA, MARIEKE;
HERLAAR, FRITS;
VAN STEE, MARTIJN PETRUS y
LAMBALK, JOHANNES JACOBUS MARIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 407 822 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Secuencia promotora y construcción génica para aumentar el rendimiento de cosechas en tomates.

La presente invención se refiere a una secuencia promotora que, cuando está unida operativamente a un gen de la planta aguas abajo (en dirección 3') en una planta, es capaz de aumentar el rendimiento de la cosecha en dicha planta, en particular, en el tomate. La invención se refiere además a plantas de la familia de las solanáceas, en particular, a las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), que comprende dicha secuencia promotora unida operativamente a dicho gen de la planta aguas abajo, a métodos para obtener dichas plantas y a las plantas que se pueden obtener por tales métodos.

El tomate (*Solanum lycopersicum*, también llamado *Lycopersicon esculentum*) es una planta de la familia de las solanáceas. Es una planta perenne de corta duración, que se cultiva como una planta anual, y una especie próxima a la patata. El fruto (es decir, el tomate) es una baya de colores brillantes (generalmente de color rojo, debido al pigmento licopeno) comestible, de 1-2 cm de diámetro en las plantas silvestres, comúnmente mucho más grande en las formas cultivadas. La planta se cultiva actualmente en todo el mundo por sus frutos comestibles, que son las principales hortalizas frescas del mercado en todo el mundo.

El hábito de crecimiento de las plantas de tomate se clasifica comúnmente como determinado o indeterminado. Esta clasificación depende de la capacidad del sistema de brote para el crecimiento simpodial continuo. Las variedades de cultivo indeterminadas (cuando el meristemo apical crece indefinidamente y surgen flores del meristemo axilar) producen sistemas ramificados que crecen indefinidamente, mientras que las variedades de cultivo determinadas (donde el meristemo apical se convierte en flores terminales) producen sistemas ramificados con progresivamente menos nodos hasta que el brote termina con dos inflorescencias y desarrolla la forma de un arbusto. Este cambio en la arquitectura de la planta se debe a una mutación en el gen de autopoda (abreviadamente SP por la expresión inglesa *SELF-PRUNING*) (Pnueli et al., *Development* 125: 1979-1989, 1998) y ha sido un desarrollo importante para esta cosecha, debido a que los tipos determinados pueden ser cosechados mecánicamente, y por tanto se utilizan principalmente para la industria de transformación, mientras que los tipos indeterminados se cultivan generalmente en invernaderos y se utilizan en el mercado de productos frescos.

Fridman et al., (*Mol. Genet. Genomics*, 266: 821-826, 2002) han demostrado previamente que la introgresión de un alelo de *S. pennellii* de un locus de un carácter cuantitativo (abreviadamente QTL por la expresión *quantitative trait locus*) llamado PW9-2-5 en un antecedente de sp/sp *S. esculentum* da como resultado un crecimiento semi-determinado con 2 hojas entre los racimos (designado como SPI = 2). Dichos autores sugirieron que el gen SP9D de *S. pennellii*, SP9Dpen, es el gen candidato para el cambio de la arquitectura de la planta y también el llamado contenido sólido sólido (abreviadamente SSC por la expresión inglesa *Solid Solid Content*) o el índice de refracción (que está relacionado indirectamente con el sabor). El gen SP9D pertenece a la familia de genes CETS (CENTRORADIALIS, Flor Terminal) y se cree que esta familia de genes desempeña un papel clave en la determinación de la arquitectura de la planta (Carmel-Goren, *Plant Mol. Biol.* 52: 1215-1222, 2003).

S. lycopersicum tiene seis miembros de la familia de genes CETS, llamados SP, distribuidos en cinco cromosomas diferentes: SP2I, SP3D, SP5G, SP6A y SP9D, en donde los nombres se dan de acuerdo con el orden de posición (Pan et al., *Genetics* 155: 309-322, 2000). El sexto miembro, SP, se encuentra en el cromosoma 6, orden de posición E, y se sabe que es el gen que altera el tomate en un fenotipo determinado (sp/sp)/ indeterminado (SP/-). Las relaciones filogenéticas agrupaban SP3D, SP5G y SP6A con el gen FT de *Arabidopsis*. Los SP9D y SP está agrupados con TFL-1 de *Arabidopsis* y SP2I está en la misma rama con la Madre del Tiempo de Floración (abreviadamente MFT por la expresión *Mother of Flowering Time*) de *Arabidopsis* (Carmel-Goren et al., *supra*). A pesar de las relaciones filogenéticas entre los genes, los perfiles de expresión difieren. Por lo tanto, la expresión de SP5G se ha encontrado predominantemente en cotiledones, mientras que SP3D se expresa principalmente en los órganos florales con baja expresión en las hojas de órganos vegetativos. Para SP6A no se ha encontrado hasta ahora ninguna expresión. SP9D se expresa principalmente en el ápice de los brotes y tiene una alta expresión en las raíces, mientras que SP2I se expresa en todos los órganos estudiados. A pesar de estos perfiles de expresión se conoce poco sobre su función con SP como excepción.

Durante las últimas décadas, la reproducción de tomates indeterminados se centró principalmente en el rendimiento, resistencia a las enfermedades y aspectos de calidad del fruto, tal como la maduración y el sabor uniformes. Se han conseguido mejoras en el rendimiento gracias a los nuevos métodos de producción, mejora de la gestión de plagas y variedades que estén mejor adaptadas a los nuevos métodos de producción, pero las ganancias en rendimiento se han hecho más pequeñas. Nuevas variedades con 5 o 15 frutos más por planta dieron un aumento en el rendimiento del 2-4%.

El desarrollo de variedades con mayor rendimiento se vio obstaculizado por la falta de conocimiento sobre los aspectos que determinan el rendimiento de los tomates. Xiao (2004; ISHS *Acta Horticulturae* 654 (*International Workshop on models for plant growth and control of product quality in horticultural production*)) y Heuvelink (2005; ISHS *Acta Horticulturae* 691 (*International Conference on sustainable greenhouse systems - greensys2004*; 43-50)) simularon que una variedad de tomates con dos hojas entre racimos en lugar de las tres hojas convencionales desplazaría hacia la asimilación hacia los frutos, dando como resultado mayores rendimientos cuando se mantiene el índice

del área foliar (abreviadamente LAI por la expresión inglesa *Leaf Area Index*). Dichos autores validaron los datos simulados mediante la eliminación de una de cada dos hojas y manteniendo el LAI por encima de 3. Como simulación, el rendimiento aumentó en aproximadamente 10%.

5 Las variedades cultivadas con dos hojas entre los racimos no son conocidas, sin embargo, hay variedades silvestres del tomate con dos hojas entre los racimos, es decir, que tienen un índice simpodial = 2 (SPI = 2), tales como *Solanum neorickii*, *Solanum chmielewskii*, *Solanum chilense*, *Solanum peruvianum*, y *Solanum pennellii*. La propiedad de un índice simpodial de 2 es recesiva para el índice simpodial de 3 en tomates cultivados de híbridos F1 del cruzamiento entre especies con *S. pennellii* (Pnueli et al., 1998, *supra*). Sin embargo, no se conoce hasta la fecha la base genética de SPI = 2,

10 A medida que la población mundial sigue creciendo, la demanda de hortalizas frescas, tales como tomates, es cada vez mayor en todo el mundo. Por lo tanto, existe una continua necesidad de medios y métodos para mejorar el rendimiento de hortalizas, tales como el tomate.

El objeto de la presente invención es proporcionar nuevos medios y métodos para aumentar el rendimiento de cosechas en plantas de la familia de las solanáceas.

15 El objeto de la presente invención, en particular, es proporcionar nuevos medios y métodos para aumentar el rendimiento de cosechas de tomate, *S. lycopersicum*. Estos objetos se consiguen por los medios y métodos descritos en las reivindicaciones adjuntas.

Estos objetos se consiguen por los medios y los métodos descritos en las reivindicaciones anexas.

20 Específicamente, estos objetos se consiguen proporcionando una secuencia promotora SP3D, que es capaz de dirigir la transcripción de un gen SP3D aguas abajo que está unido operativamente a dicha secuencia promotora, en donde la secuencia promotora procede de una especie de la familia de las solanáceas, que tiene un índice simpodial de 2, para la reducción del índice simpodial en plantas que tienen un índice simpodial de 3 o más.

La secuencia promotora comprende un resto de CA en una posición de los nucleótidos 62-61 aguas arriba (es decir, en las posiciones -62 y -61 nt) del codón de iniciación de dicho gen SP3D.

25 En la investigación que ha conducido a la presente invención, se identificó un nuevo gen de la familia de genes CETS que da lugar a SPI = 2. Por lo tanto, la línea de introgresión 49015-2 que contenía una inserción 1a716 en *S. pennellii* del cromosoma 3 demostró que daba un índice simpodial de 2. Basándose en la localización en el mapa y el fenotipo se llegó a la conclusión de que la propiedad SPI = 2 de la línea 49015-2 es causada por el gen SP3D de *S. pennellii*, que se designó "SP3Dpen".

30 De acuerdo con la invención, posteriormente se encontró que la propiedad SPI = 2 no estaba causada por el gen en sí mismo, sino que era debida a la regulación del gen por dicho promotor. En particular, se demostró que el índice simpodial de 2 estaba vinculado a un resto de CA en los nucleótidos (nt) 62-61 de la secuencia promotora aguas arriba desde el comienzo del gen SP3D, es decir, el nucleótido en la posición -62 es C y el nucleótido en la posición -61 es A.

35 Como se describió anteriormente, en los brotes simpodiales de tomate (*S. lycopersicum*) las fases vegetativas y reproductivas se alternan regularmente. El brote primario normalmente aparece después de la producción de 8-10 hojas y el crecimiento continúa luego a partir del capullo lateral superior (axilar) justo debajo de las inflorescencias. Este brote genera luego generalmente tres hojas más antes de terminar a su vez con otra fluorescencia y así sucesivamente. Por lo tanto, el brote está compuesto predominantemente de un número de unidades simpodiales reiteradas que consiste cada una en tres nudos vegetativos y una inflorescencia terminal, que se sabe que tiene un índice simpodial de 3 (SPI = 3).

40 De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado ahora que mediante la introducción de una de las secuencias promotoras descritas anteriormente en unión operativa con un gen SP3D en una planta de la familia de las solanáceas que tenga un índice simpodial de 3 o más, se produce una planta que tiene un índice simpodial reducido en comparación con las plantas que no tienen dicho promotor.

45 El índice simpodial se reduce a un índice de simpodial de 2. Por lo tanto, resulta una planta que tiene un índice simpodial de 2, es decir, la planta en la que el brote está compuesto principalmente de unidades simpodiales que constan de dos nudos vegetativos y una inflorescencia terminal. De acuerdo con la presente invención, un "índice simpodial de 2" se refiere a un índice simpodial medio de 1,6 a 2,5 ambos inclusive, preferiblemente entre 1,6 y 2,5, más preferiblemente entre 1,7 y 2,4, incluso más preferiblemente entre 1,8 y 2,3, lo más preferiblemente entre 1,9 y 2,2.

50 De acuerdo con la invención, por tanto se ha encontrado ahora que la secuencia promotora, cuando está unida operativamente a un gen SP3D, conduce a un aumento del rendimiento de las cosechas en las plantas. Así, por ejemplo, una planta que tenga un índice simpodial que se reduce de 3 a 2, tendrá predominantemente dos hojas entre los racimos en lugar de tres, de tal manera que los simpodios son aproximadamente 1/3 más cortos que los correspondientes con SPI = 3, lo que conducirá a un aumento del número de racimos por unidad de longitud de la planta.

Además, los racimos sucesivos aparecerán antes en el tiempo, de tal manera que se obtiene también un aumento del número de racimos por unidad de tiempo. Además, se ha encontrado que la secuencia promotora conduce a un aumento del rendimiento de las cosechas sin el hábito de crecimiento semi-determinado del gen SP9Dpen.

5 Por otra parte, el promotor, cuando está unido operativamente al gen SP3D, da lugar a varios otros rasgos beneficiosos, tales como la aparición de un primer racimo después de 6-8 hojas en lugar de aproximadamente 10 hojas. Además, en estas plantas se podrían mantener más frutos por racimo (aproximadamente un fruto más por racimo). Estas características dan como resultado un aumento del número de racimos de frutos por metro o unidad de tiempo y/o un aumento del número de frutos por racimo y por lo tanto un mayor rendimiento de la cosecha.

10 Se debe advertir que, de acuerdo con la presente invención, el término "rendimiento de las cosechas" se define como la cantidad (por ejemplo, expresada en kg) de producto (por ejemplo, fruto, por ejemplo, tomates) por metro de brote y ramas de la planta, o por unidad de tiempo (a partir de la siembra inicial hasta el final de la cosecha o la terminación de la temporada de crecimiento, por ejemplo, expresada en meses). Un aumento en el rendimiento de la cosecha de las plantas que comprenden la secuencia promotora de la invención está relacionado con el aumento en el rendimiento de la cosecha en comparación con el rendimiento de la cosecha de las mismas plantas que no comprenden la secuencia promotora de la invención.

15 En una realización preferida de la invención, la secuencia promotora procede de una especie de la familia de las solanáceas seleccionada del grupo que consiste en *Solanum pennellii*, *Solanum neorickii*, *Solanum chmielewskii*, *Solanum chilense*, y *Solanum peruvianum*

20 De acuerdo con la invención, dicha secuencia promotora comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad con los nucleótidos 1251 a 1874 de la SEQ ID NO: 1 (Fig. 2).

De acuerdo con realización preferida de la invención, la secuencia promotora comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad con los nucleótidos 1251 a 1874 de la SEQ ID NO: 1.

25 De acuerdo con la presente invención, la expresión "una secuencia de nucleótidos que tiene X% de identidad" se refiere a una secuencia de nucleótidos que tiene una secuencia de nucleótidos en la que X% de los nucleótidos es idéntico a la secuencia de nucleótidos específica (es decir, de los nucleótidos 1251 a 1874 de la SEQ ID NO: 1. Esta puede por lo tanto abarcar secuencias de nucleótidos que tengan el mismo número de 624 nucleótidos, pero en la que X% de los nucleótidos sea diferente en comparación con los nucleótidos 1251-1874 de dicha SEQ ID NO: 1, y/o fragmentos de dicha parte de la SEQ ID NO: 1, que comprende X% de los nucleótidos originales, (también es posible una forma mixta). Debe entenderse que en todos los casos el resto de CA debe estar presente y la secuencia promotora debe tener actividad promotora.

30 En una realización particularmente preferida, la secuencia promotora procede de *S. Pennellii* y consiste en la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 1251 a 1874 de la SEQ ID NO: 1.

35 Así, se ha encontrado, de acuerdo con la presente invención, que las plantas de la familia de las solanáceas, en particular *S. lycopersicum*, que comprenden la secuencia promotora de la presente invención, como se define anteriormente, en unión operativa con un gen SP3D, proporcionan más kg de frutos, por metro de brote y ramas y/o por unidad de tiempo, en comparación con las mismas plantas que no comprenden la secuencia promotora de la invención.

40 Lifschitz et al., (*PNAS*, 103, 6398-6403, 2006) informaron previamente que el gen SP3D es el gen causante del mutante sft de tomate (sft = single-flower truss = racimo de una sola flor). Las plantas mutantes sft son de floración tardía con un número reducido de flores por inflorescencia (1 o 2 flores por racimo) y tienen una inflorescencia indeterminada. Se demostró que la mutación de racimos de una sola flor (sft) es debida a mutaciones en el gen SP3D. Se ha demostrado que las plantas que expresan altamente el gen sft bajo el control del promotor constitutivo 35S mantenían el patrón de crecimiento simpodial, pero tenían un índice simpodial de 2, en lugar de 3. El injerto de un esqueje mutante en rizoma 35S:SFT rescataba el fenotipo de tipo silvestre (incluyendo SPI = 3), lo que demuestra

45 que SP3D/SFT media su función por una señal sistémica. La secuencia promotora de acuerdo con la presente invención y su influencia sobre el índice simpodial, y en consecuencia sobre el rendimiento de la cosecha de las plantas de la familia de las solanáceas, en particular de *S. lycopersicum*, no han sido descritos por Lifschitz et al.

La secuencia promotora de la presente invención se puede introducir en unión operativa con cualquier cDNA de SP3D.

50 La presente invención también se refiere a una construcción génica, que comprende una secuencia promotora como se describe antes y una secuencia de cDNA derivada de un gen SP3D como se describió anteriormente. Dicha construcción génica puede, por ejemplo, ser introducida en plantas usando técnicas de biología molecular conocidas, con el fin de proporcionar plantas modificadas genéticamente de la familia de las solanáceas, preferiblemente *S. lycopersicum*, con un índice simpodial reducido.

55 En una realización preferida, la secuencia de cDNA comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 75% de identidad con la secuencia de cDNA de gen SP3Dpen como se muestra en la Figura 3. Preferiblemente, la

identidad de secuencia es del 85%, más preferiblemente, del 90%, incluso más preferiblemente del 95% y lo más preferiblemente del 99%.

En una realización particularmente preferida, la secuencia de cDNA consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la Figura 3.

5 La invención se refiere además a un método para proporcionar plantas de la familia de las solanáceas que tienen un índice simpodial reducido, que comprende introducir en el genoma de una planta de la familia de las solanáceas, que tiene un índice simpodial de 3 o más, una secuencia promotora como se ha descrito anteriormente en unión operativa con un gen SP3D aguas abajo, o introducir en dicha planta una construcción génica como se ha descrito anteriormente, de tal manera que resulte una planta que tenga un índice de simpodial reducido en comparación con dicha planta sin dicha secuencia promotora.

De acuerdo con la invención, el índice simpodial se reduce a un índice simpodial de 2.

15 La invención se refiere además a un método para aumentar el rendimiento de las cosechas en una planta de la familia de las solanáceas que tiene un índice simpodial de 3 o más, que comprende introducir en el genoma de dicha planta una secuencia promotora como se ha descrito anteriormente, en unión operativa con un gen SP3D aguas abajo, o introducir en dicha planta una construcción génica como se ha descrito anteriormente.

En realizaciones preferidas de los métodos antes identificados, la planta se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en *S. habrochaites*, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* y/o plantas procedentes de ellas. En una realización particularmente preferida, la planta es *S. lycopersicum*. El término "plantas procedentes de ellas" se refiere, por ejemplo, a las plantas procedentes del cruzamiento de dos especies seleccionadas, tales como, por ejemplo, plantas procedentes de un cruzamiento entre *S. habrochaites* y *S. lycopersicum*.

20 La secuencia promotora y/o la construcción génica se pueden introducir en estas plantas por introgresión mediante técnicas de reproducción convencionales, tales como las descritas más adelante, o alternativamente usando técnicas de biología molecular adecuadas, que son bien conocidas por los expertos. La introducción de la secuencia promotora, o la introducción de una construcción génica adecuada que comprende la secuencia promotora y una secuencia de cDNA de un gen SP3D de la invención, en células de plantas pueden efectuarse, por ejemplo, por transfección, microinyección, electroporación, etc. También es posible utilizar transformación mediada por *Agrobacterium*. Luego las células pueden ser regeneradas en plantas enteras.

30 De acuerdo con la invención, se ha demostrado que mediante la introducción de la secuencia promotora de la invención en unión operativa con un gen SP3D, o mediante la introducción de la construcción génica de la invención en especies de la familia de las solanáceas, que normalmente (es decir, sin la secuencia promotora) tendrían un índice simpodial de 3 o más, por ejemplo, un índice simpodial de 3, ahora se pueden obtener plantas que tienen un índice simpodial reducido de 2, que dará lugar a un aumento en el rendimiento de las cosechas.

35 Además, se ha encontrado que, en el caso del tomate, *S. lycopersicum*, el primer racimo aparece después de 6-8 hojas en lugar de aproximadamente 10 hojas. Por otra parte, podrían mantenerse en estas plantas más frutos por racimo (aproximadamente un fruto más por racimo). Por lo tanto, se obtienen plantas que darán lugar a un aumento del rendimiento de las cosechas en comparación con las mismas plantas que no comprenden la secuencia promotora.

40 La secuencia promotora de la invención se puede introducir en unión operativa con un gen SP3D que es endógeno para la planta, es decir, con el gen SP3D que existe normalmente en dicha planta. En este caso, sólo se introduce la secuencia promotora, es decir, la secuencia promotora endógena es sustituida por una secuencia recombinante seleccionada de la secuencia promotora de la invención, que está en unión operativa con el gen SP3D endógeno de dicha planta. Sin embargo, también es posible introducir tanto la secuencia promotora como el gen SP3D, o una construcción génica de acuerdo con la presente invención, tal como se ha definido anteriormente. En ambos casos, se introducen la secuencia promotora y el gen SP3D en la planta, siendo por tanto ambos exógenos para dicha planta.

45 La invención se refiere además a plantas de la familia de las solanáceas, obtenidas mediante dicho método y que tienen un índice simpodial reducido de 2. La práctica normal en la reproducción del tomate implica el injerto de una variedad de tomate en un rizoma resistente a las enfermedades para controlar enfermedades transmitidas por el suelo. Los rizomas son generalmente más vigorosos que los tomates no injertados. El injerto puede realizarse, por ejemplo, en los epicótilos, antes de las primeras hojas, en un híbrido entre *S. lycopersicum* y una variedad silvestre.

La planta de la invención se puede seleccionar del grupo que consiste en *S. habrochaites*, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* y/o plantas procedentes de ellas.

La invención se ilustra además por los siguientes Ejemplos y Figuras.

55 La Figura 1 muestra las secuencias de cebadores utilizadas para el escrutinio de una genoteca BAC de *S. pennellii* y la selección de las plantas.

La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, es decir, la secuencia de nucleótidos genómica del gen SP3Dpen incluyendo la secuencia promotora (nucleótidos 1251-1874). El resto de CA se ha indicado en negrita y se ha subrayado; los recuadros grises y la región subrayada doble indican el codón SP3D, las letras minúsculas indican un SNP en el CDS, en comparación con *S. lycopersicum*.

- 5 La Figura 3 muestra la alineación del cDNA de SP3Desc y su traducción a aminoácidos (es decir, derivado de *S. lycopersicum*, conocido también como *L. esculentum*) con el cDNA de SP3Dpen y su traducción a aminoácidos, indicando que los cambios de 4 nucleótidos (recuadros grises) en las regiones codificadoras son sinónimos.

- 10 La Figura 4 muestra la alineación de la región promotora de SP3Dpen de los nucleótidos 544-580 con otras variedades silvestres de la familia de las solanáceas, indicando que los restos de CT o TA señalados con una flecha están relacionados con SPI = 3 y un resto de CA está asociado con SPI = 2.

La Figura 5 muestra la alineación de las secuencias de DNA de la región promotora de SP3Dpen 1-624 con otras variedades silvestres de la familia de las solanáceas, indicando que los polimorfismos aguas arriba y aguas abajo del resto de CA no están relacionados con las propiedades SPI = 2 o SPI = 3. Las barras grises indican una coincidencia < 49%.

- 15 La Figura 6 es un esquema de la reproducción de un híbrido F1 con y sin gen SP3D. Los nombres en los recuadros negros son SP3Dpen, en los recuadros blancos son SP3Desc y en los recuadros grises son heterocigóticos.

- La Figura 7 es una tabla en la que se comparan los fenotipos de los híbridos F1 homocigóticos y heterocigóticos. Los resultados dados son los resultados medios de 4 plantas. 15751 es una planta de *S. lycopersicum* de la invención, que comprende la secuencia promotora de la presente invención en unión operativa con el gen SP3D en forma homocigótica, 15753 es una planta de *S. lycopersicum* de la invención, que comprende el gen promotor/SP3D en forma heterocigótica. Es evidente, que tanto las plantas homocigóticas como heterocigóticas tienen un índice simpodial reducido en comparación con la planta 15769, que es una planta normal de *S. lycopersicum* que no comprende la constitución genética promotor/gen SP3D de la invención. SPI es el índice simpodial. N° de frutos es el número total de frutos cosechables, N° de racimos es el número total de racimos formados durante el período de examen (es decir, un total de 4 meses) y "N° de hojas 1 racimo" es el número total de hojas hasta el primer racimo.
- 20
- 25

Ejemplos

Ejemplo 1

Clonación y aislamiento de SP3Dpen

- 30 Se utilizó el gen SP3D de *Solanum esculentum* (número de acceso AY186735) para la clonación del gen 1a716 de *Solanum pennellii*. Se escrutó una genoteca BAC de *S. pennellii* con los cebadores SP3D-f2/SP3D-r: 40 ciclos a 92°C durante 30 segundos, a 60°C durante 30 segundos y a 72°C durante 60 segundos, dando como resultado BAC52,1c06e11 que alberga SP3Dpen (Fig. 1).

- 35 Posteriormente, BAC51,1c06e11 se sometió a doble digestión con BamHI/SpeI y se ligó en el material doblemente digerido con XbaI/BamHI del pUC18 para crear subclones. Posteriormente, se escrutaron los subclones con el marcador SP3D-f2/SP3D-r para identificar el clon individual que albergaba SP3Dpen. Se secuenció el clon KEZ504 y contenía el gen/locus completo SP3D de *S. pennellii*, designado SP3Dpen, SEQ ID NO: 1 (Fig. 2). La comparación del cDNA de SP3D de *S. lycopersicum*, número de acceso AY186735, con el cDNA de SP3D de *S. pennellii* reveló que SP3Dpen tenía 4 cambios de nucleótidos. Dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) se encuentran en el primer exón en la posición 15 (T=>C) y 120 (C=>T), el tercer SNP se encuentra en el segundo exón en la posición 270 (C=>T) y el cuarto SNP está situado en el cuarto exón, en la posición 387 (G=>A), véase la Fig. 3. Todos estos SNP eran sinónimos. Por consiguiente, se llegó a la conclusión de que la propiedad SPI = 2 no fue originada por el gen propiamente dicho sino debido a la regulación del gen.
- 40

Ejemplo 2

SNP causal en el promotor, variedades silvestres

- 45 Una de las claves de la determinación de las especies de *Solanum* es el índice simpodial. Las especies con dos hojas entre racimos (SPI = 2) son *Solanum neorickii*, *Solanum chmielewskii*, *Solanum chilense*, *Solanum peruvianum* y *Solanum pennellii*. Las especies con tres hojas entre racimos (SPI = 3) son *S. habrochaites*, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum*.

- 50 Para verificar la hipótesis de que SPI = 2 es originada por un cambio aguas arriba del gen, se han estudiado varias variedades silvestres. Se volvieron a secuenciar cincuenta y tres variedades silvestres de las especies mencionadas utilizando cebadores SP3D-10fa y dSP3D-r1. Del grupo de 53 variedades silvestres, 11 correspondían a *S. cheesmaniae*, 2 correspondían a *S. chilense*, 7 correspondían a *S. habrochaites*, 10 correspondían a *S. neorickii*, 1 correspondía a *S. pennellii*, 7 correspondían a *S. peruvianum*, 11 correspondían a *S. chmielewskii*, 1 correspondía a *S. lycopersicum* y 3 correspondían a *S. pimpinellifolium*.

Las comparaciones de las secuencias revelaron un resto de CA de 62-61 nucleótidos aguas arriba de la iniciación del gen en todas las especies con SPI = 2, mientras que las especies con SPI = 3 presentaban un resto de nucleótidos CT o TA, véase la Fig. 4. Por otra parte, los polimorfismos aguas arriba y aguas abajo del resto de CA no estaban relacionados con el índice simpodial (véase la Fig. 5).

5 Ejemplo 3

Fenotipos de híbridos F1 con y sin SP3Dpen

- La línea de introgresión 49015-2 que albergaba el SP3Dpen de 1a716 de *S. pennellii* se cruzó con las líneas OT1464 y OT1690 de *S. lycopersicum* de Enza Zaden. Los híbridos F1 resultantes se retrocruzaron con OT1464 o autoalimentaron en el caso del cruce con OT1690. Las plantas con SP3Dpen se seleccionaron con dSP3D-1fr del marcador dCAPS; cebadores dSP3D-f/dSP3D-r, condiciones de la PCR, 40 ciclos a 92°C durante 30 segundos, a 55°C durante 60 segundos y a 72°C durante 60 segundos, digeridos por HpyCH4V, separados en agarosa ms-8 al 3% (Hispanagar). Además del marcador dSP3D-1fr, se utilizó el retrocruzamiento asistido por marcador para identificar el progenitor recurrente más alto, como es conocido por los expertos en la técnica, dando como resultado la planta NT05-96c11 para el antecedente OT1464 y NT05-108h10 y NT05-108e12 para el antecedente OT1690. Estas plantas individuales fueron autoalimentadas 2 veces, seleccionadas de nuevo con el marcador dSP3D y retrocruzadas asistidas por marcador, dando como resultado las plantas 111B6 para el antecedente OT1464 y las plantas 117F1 y 117G1 para el antecedente OT1690. A continuación, se obtuvieron los híbridos F1 cruzando 111B6 x 111F1 dando como resultado 15751 (SP3Dpen homocigótico), 111B6 x 117G1 dando como resultado 15753 (heterocigótico) y OT1690 x OT1464 dando como resultado 15769 como el control homocigótico SP3Desc, véase la Fig. 6.
- Se cultivaron cuatro plantas por híbrido en invernadero durante junio de 2006 - finales de octubre de 2006 de conformidad con la práctica normal de cultivo y se evaluaron para determinar el índice de simpodial contando el número de hojas entre racimos sucesivos, el número de hojas hasta el primer racimo, el peso medio del fruto, el rendimiento, el número de frutos y los racimos. El índice simpodial medio fue 2,4 para SP3Dpen, 2,5 para las plantas heterocigóticas y 2,7 para SP3Desc (Fig. 7). Como era de esperar, el número de hojas hasta el primer racimo había cambiado y disminuido desde 7,5 para Sp3Desc hasta 5,8 para Sp3Dpen e híbridos heterocigóticos. El peso medio del fruto fue similar entre híbridos variando desde 57 hasta 59 g/fruto. Como era de esperar, el número de racimos aumentó, desde 9 para SP3Desc hasta 14 para SP3Dpen. El número de frutos por racimo aumentó desde 6,7 para SP3Desc hasta 7,6 para SP3Dpen. Esto añade aproximadamente 0,7 kg al rendimiento total de híbridos F1 de SP3Dpen homocigóticos durante este período de cultivo.
- Estos datos revelan que la mejora del rendimiento total observada después de 5 meses en las plantas que comprenden la secuencia promotora de la invención en comparación con las plantas que no comprenden dicha secuencia promotora, es debida a un aumento del número de racimos y en el caso de SP3Dpen homocigótico también a un aumento del número de frutos por racimo. Como resultado, el rendimiento total de 4 plantas por híbrido se mejoró de 3,5 kg a 5,0 kg y 6,0 kg para SP3Desc, SP3Desc/pen y SP3Dpen, respectivamente.
- La mejora del rendimiento por SP3Dpen es debida a la secuencia promotora de SP3Dpen, que comprende el resto de CA de 62-61 nucleótidos aguas arriba del comienzo del gen.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Secuencia promotora del gen SP3D, capaz de dirigir la transcripción de un gen SP3D situado aguas abajo que está unido operativamente a dicha secuencia promotora, en la que la secuencia procede de una especie de la familia de las solanáceas que tiene un índice simpodial de 2, para reducir el índice simpodial en plantas que tienen un índice simpodial de 3 o más, en la que dicha secuencia promotora comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad, preferiblemente al menos 99% de identidad con los nucleótidos 1251 a 1874 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 2 y en la que dicha secuencia promotora comprende un resto de CA en una posición de 62-61 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación de dicho gen SP3D.
- 10 2. Secuencia promotora de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la secuencia promotora precede de una especie de la familia de las solanáceas seleccionada del grupo que consiste en *Solanum pennellii*, *Solanum neorickii*, *Solanum chmielewskii*, *Solanum chilense* y *Solanum peruvianum*.
- 15 3. Secuencia promotora de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la secuencia promotora procede de *S. pennellii* y consiste en la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 1251 a 1874 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 2.
- 20 4. Construcción génica que comprende una secuencia promotora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y una secuencia de cDNA de un gen SP3D de planta.
- 5 5. Construcción génica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la secuencia de cDNA comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 75% de identidad, preferiblemente al menos 85% de identidad, más preferiblemente al menos 90% de identidad, incluso más preferiblemente al menos 95 de identidad y lo más preferiblemente al menos 99 % de identidad con la secuencia de cDNA de SP3Dpen mostrada en la Figura 3.
- 25 6. Construcción génica de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que la secuencia de cDNA consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 3.
- 30 7. Método para proporcionar plantas de la familia de las solanáceas que tienen un índice simpodial reducido, que comprende introducir en el genoma de dichas plantas una secuencia promotora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en unión operativa con un gen SP3D aguas abajo o introducir en dichas plantas una construcción génica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, de tal manera que el índice simpodial de la planta con la secuencia promotora o la construcción génica se reduzca hasta un índice simpodial de 2 en comparación con la planta sin dicha secuencia promotora o construcción génica.
- 35 8. Método para aumentar el rendimiento de las cosechas en una planta de la familia de las solanáceas que tienen un índice simpodial de 3 o más, que comprende introducir en el genoma de dicha planta una secuencia promotora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en unión operativa con un gen SP3D aguas abajo o introducir en dicha planta una construcción génica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
- 40 9. Método de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que la planta se selecciona del grupo que consiste en *S. habrochaites*, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum*, preferiblemente en el que la planta es *S. lycopersicum*.
10. Planta obtenible por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que tiene una construcción génica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, de tal manera que el índice simpodial de la planta con la construcción génica se reduzca hasta un índice simpodial de 2 en comparación con la planta sin dicha construcción génica.

FIG. 1

Secuencia de cebador	nombre del cebador
AGG AGT ACT CTT GTG TTG TGT TTT TG	dSP3D f1
AAC AAG AGG ATC GCG TTC TCT A	dSP3D r1
GGA CGT ATG CGA TGT ATC GGG AT	sp3d 10fa
CCC ACA CTA CGC CAA AAG TT	SP3D f2
AGT AGA TGG AGT TGA TCA ATC AGC A	SP3D R

FIG. 2-2

AAAAAAGGGTACAGAAAATAGTGCACCAATAGAATCACTTCTCACCTCTTTATAGCTAGT
 ACGGATTATTCCTTCATGTGTGCCACAGTCATGAACAATCCATATTATAATTTCCGGACA
 TAATTAATTGTTTCATATATCTATTAACATAAATAAATTTACCATTATTCTTTTTACTTAT
 AAAGTAGATACATTAATAAATTTAAGATTTCCAGAAAGTTCTACATTTTTCAAATAATC
 AATTGAGGGTATAAAAAAGTTGTCCCTTCCCTTAATTTCTCAAGATGAATAAGTAATTAAGA
 ACRAATAAAAAAGCGAACAAATGAATATTTATCAATCCTCATTTCACCAAGTCATTAATA
 TTATTTTATGACCTAAATGTTTACTCATTGCTTAAATATCAAGAAAATTTGTTGAATTA
 TCTCTTATAGAAATATCACTCAACATCAATATCTAATTAGTACTCATTTCGTTTTTATTT
 ATATGTCGTTTTTATTAATAATAGATGTTTTTTTTAATATTTATCATTTTACAAAATCAA
 ATTTGACTTATGATTACTAAATAATTAATTCATTTAATTAATCAAATAAATTAATTTA
 TCTCTTATTTAAAAGTTGACTTTAAGAAAACACCAATTAATAATAATAAATTAAGCTTAG
 CTAGTTTTTTAAAAGATATAAAATCTAAATCAGTGACATATAAATAGAAAACAGAGGGGAA
 AGTAGTAGTTAACTCTTATGGTTTGTAAAGGTGCGTGCTAAATGACAACATCTTTCTTG
 TCTTGTAAGTTAACATCTTAGTAGGTGGTGAGTAAGTGAGTGAATGCCATTGAATGAAG
 AGATTATTTGTTTTGTCACCTTACCCTAAAGTTTTGCTATTTTTATTCTTTGAATT
 CCTCCTGTACAAGATTTATTTTTGATATTCCTTTCTTTTGGAAATTCAGAAATGGGTATA
 ACAGGACTATTTGGCTATCACACATATATTTTAAACAAAATCAATATTTAGACATTT
 AGTTCACATTTTCATGGATTATACTCGTTAGAAAAAGTATATTTAAGCAATTAATATTTAT
 TTGTTAAACATAGAAAAATGATTTGAAATATATTCAAACCTTTGATCACAAATTTGGGTAAC
 AATTTCAAATCTTGGGAAGGACCTTTTATTTCCCTTGCCTATTTATAGTGTATTTTAA
 TGTATATATATGTCAACATAAATATCATAAATATTACATTATTATATATAGTAACTTGT
 CACGTGGACACATGTATACCTGTAAAATATACTATTAATAGTATAGGAGATAGTAGGTC
 CTGCTCAAAGTTAGAGATTGTTATAGCAATTTGATCAAAGATATATTTCGAACTATTT
 TCCTAAAAGATATAACCAAATACAATTTTATCTTTAATTTCAAATTTGCAAATAAAGTG
 AAAAAAATATTTATACCAAGTAGGATGAATTAATAAATTAAGGGTTTTTTTTCTTGTCTA
 TTTCTTCTGTTATATATGACTAATCATCATTTTTTTATTAATGAATCGTGGCAG
 GTGAGAATCCTCTTTTTGTTA
 ATTGTTGTTTGTGCTTCCCATGTTTACATTTTTTTTTAAAAAAAATAAATTTTAA
 AGGTAGAATAAAAAAATCATTATCGCATTAAAAATATATGTTTATAATAACATAGA
 CGAATAATATGAACTAACGGAGTAATGACAAAGGAATTTATACTGAGCGGGCAATGTTG
 CGTTAATCATGTTGGTCCAAACTTTTAAACCTTAGGAAAGGGAAATGAAATCTATTCTC
 AATTAACGTGATTAATATCTAAACAATTGATATCCTTTAATTATGTCCACACTACTC
 CAAAAGTTCTTAAGCACTACACTCTAAAATTTGTATACATAACATTAAGATCATTACC
 TATTTGGCTAAATTTTACAATAAGTTATTTTAAAAAGTGTTCCCTTTTTTTCTCTC
 AAAACACACTTGTGTTTCTCTTGATTTTTCTCTCAAAGTTTAGTTAAATACTTAGTTT
 TTTTCAAATAATTTTTTATGAAAAAGAAAAAAAACATTTTTGGCTAACCAAACAGGT
 TTAGGAGATTTGCGCTCTGCCATAAGTATTTCCCATTCACTTTTCTTCCATTTTTATTT
 ATGATTTTTTTAACATATTAAGAAAGATATTTGTTTCATGCTCTTCATTAATTTCTTAT
 CCTCCAAATTAACATAGATATTGTGGTAAAACACCATAATAGTTATTGTATATTTGTATA
 CCTTTCAAATGTATATACTCTCTCTAATCCTTTGTTTCTTGGTTTAAAGATCACAAGAT
 AGATAAAAAACATTTATTGGTGAATAAATTTGACATAACTTTAATTTAATTATGACACG
 AAATTCAAAAGTTTTATTTCTTAACTTAAAAATTTGGTGTCAAGTCAGAAGTAGATGTGA
 TAATTTTGTTTTGAATTTGGAGGGAGTATCTTGTTGAAAATATTGGATATGTACATAAG
 AAGTAGTCATTTGAAATGCATGGAACTTGATAAAAAACATAAGTAGCTAGCTAGTGCATG
 AAAGTTTGGTTGTTTATGTTCTTTAATATGTAG
 TCAACTCCATCTACTACAAAAAAA

FIG. 2-3

AACAAATGCATCCCTCCCCTTTTTATATTTTTAGCTAATAATAACCACCAATATCTACTA
TCACTACTACTTTTTCTTACAACCTTAGTAGTATCTATATATATCTTTTTTAATCTACTCT
TTTACTTCTTTACTATATTGTCTTCCACACTACTATACACTACTATTGCTATTATCTTTC
GTCTCAATTTATTTGAATTAGTGACTTGATACCAAGTTTCAAGAAAGAAATAAAGACTGA
CTTTTGAATTTTGTGATTTACAATAAGTTGTACATATTTGTATGACTATTTTAAAAGTTT
AAATTATTATTAAATATAATTAATTTAAAAGGAAAGTAAATTATATAACATGTTAATTAAT
TTTTTTTTAATTTAGCTTTTAAAAGAAAGAAATTAACACAATTAAGAAAGTATTGAATGA
AAGAAGTTTGTACCTAGTTTCTGTTATTCCCTCTATAAAACAGTATATTTCTTGTTACTT
TTATAAATTTCTAAGATATGAACTTCCTTGACTTTTAAGTAGTATTATTTAGCATAAAAC
AAGTTCCAATAAGGAATCTTGAGTGGAAGTACTTGTAGGGCAGTAAAAGGGCCGCCTCTT
TGTCACCAAACCAGTTGAGTTTGCCTTGGAAATACAACAGTCGTCACTCAACTTCCTTTT
CCACAAAGCCTTAACAGTGGATATTAATGTACAAACTTACCTTCGTTCAAATGACGTACA
TAATTACATTTACATTCATCATGAAAAATTTGCTTCGTCTATCTTTAATTGTCATGATT
TCTATTATTATAAAAAATTTAATTAACATTTTAATATGTATATATTCATCATATTGATAA
GTAAAAAATTACAAGTTATAGTACTTTTCATAGAGTTTTTGTATATCTGTTTTTTTTTAA
AAATATCAAATTAATAATAACTAATTCAACTTTAAAATTAGTTTAATTAATTTTCGAAAA
ACGCAAATAACAAATAAAAAATGGAAAAGTAGATAATATAAAATTAATAATAATAAATCTG
ATTAATAACTATAGTCTAATTTATATAAAGGAACCCTAAGAATCTTCTAACTTATCCATTA
CAAAGGATGTAATTTATGGAGTTAACAGACGTGTATATAGATAGACTTGAAAGTAAAAG
AAAATTTAACTCTAGGAACCTTCTCTATAAATACGGTTGCTAGGAGCTCCTAATAAAATG
TGTCTCCATCCATCAAGCAAACCTACCTACAAGATATGCATAACTTTTCGCGATTTCGATTC
TCGAGTCATGATAACTTCTATTATAATTCATCAAAGGATAAATTAACCCGTATATCTAGA
ACAACAAATAATTAGTACAAGAACTAAACAGAAAATAATACTAACAGAAAGAAAGACAA
AAACAAGATCAAACCAAACCTATATATATATATAAATAGAAATCCTCCAAAACCTGAA
AGTCACGAGTAAAAAATCTAGTAAAAATAAATACAAGTGATAAAAGTGGACCATAAC
AAGTCATCTCAAGGGCAAAGACTAGAGTCGACCTGCAGGCTGCAGC
//

FIG. 3

cDNA de SP3Dsec
 ATGCTAGAG AACGGATCC TCTTGTGTT GGTCTGTGG TAGGGATGT ATTGGACCT TTCACAAGA CTATTGGCT
 M F R E X D P L V V G R V Y G D V L D P F T X T I G L
 cDNA de SP3Dpen
 ATGCTAGAG AACGGATCC TCTTGTGTT GGTCTGTGG TAGGGATGT ATTGGACCT TTCACAAGA CTATTGGCT
 M F R E X D P L V V G R V Y G D V L D P F T X T I G L
 cDNA de SP3Dsec
 CAGAGTTATA TATAGAGTA GAGAGTTAA TAATGATCG GAGCTTAGCC CTTCACAT TATTACCA CCAAGGGTTG
 I R V I Y R D X E Y N N G C E L R P S Q V I M Q P R Y E
 cDNA de SP3Dpen
 CAGAGTTATA TATAGAGTA GAGAGTTAA TAATGATCG GAGCTTAGCC CTTCACAT TATTACCA CCAAGGGTTG
 I R V I Y R D X E Y N N G C E L R P S Q V I M Q P R Y E
 cDNA de SP3Dsec
 AATTGGAGG AGATGACCTA CCFACCTTT TCACITGGT TATGGTGGC CCTGATGCT CAAGTCCGAG TGATCCAAAT
 I V G G D D L R T F T L V M V D P D A P S P S D P N
 cDNA de SP3Dpen
 AATTGGAGG AGATGACCTA CCFACCTTT TCACITGGT TATGGTGGC CCTGATGCT CAAGTCCGAG TGATCCAAAT
 I V G G D D L R T F T L V M V D P D A P S P S D P N
 cDNA de SP3Dsec
 CTGAGAGAT ACCCTCAGG GTTGGTCAG CATATCCAG CTACCACAG TTCAGTTTT GGGCAGAAA TAGTGAGCTA
 L R E Y L N W L V T D I P A T T O S S F G Q E I V S Y
 cDNA de SP3Dpen
 CTGAGAGAT ACCCTCAGG GTTGGTCAG CATATCCAG CTACCACAG TTCAGTTTT GGGCAGAAA TAGTGAGCTA
 L R E Y L N W L V T D I P A T T O S S F G Q E I V S Y
 cDNA de SP3Dsec
 TGAAGTCCA AGACCATCAA TGGGAATACA TCGATTTGTA TTTGTATTAT TCAGACAATT AGGTCGSCAA ACAATGTATG
 E S P R P S M G I N X F V F V L F X Q L G R Q T V Y A
 cDNA de SP3Dpen
 TGAAGTCCA AGACCATCAA TGGGAATACA TCGATTTGTA TTTGTATTAT TCAGACAATT AGGTCGSCAA ACAATGTATG
 E S P R P S M G I N X F V F V L F X Q L G R Q T V Y A
 cDNA de SP3Dsec
 CTCAGGATG GCGTCAGAT TTCACACAA GAGATTTTGC AGACITTTAT AATCTGTTT TACCTGTTGC TCGTGTCTAT
 P G W X Q N F M T R D F A E L Y M L G L P V A A V Y
 cDNA de SP3Dpen
 CTCAGGATG GCGTCAGAT TTCACACAA GAGATTTTGC AGACITTTAT AATCTGTTT TACCTGTTGC TCGTGTCTAT
 P G W X Q N F M T R D F A E L Y M L G L P V A A V Y
 cDNA de SP3Dsec
 TTTAATTGTC AAGAGAGAG TGGCAATGTT GACCTAGAA GATCTGCTGA TTGA
 F N C Q R E S G S G X R S A D
 cDNA de SP3Dpen
 TTTAATTGTC AAGAGAGAG TGGCAATGTT GACCTAGAA GATCTGCTGA TTGA
 F N C Q R E S G S G X R S A D

FIG. 4

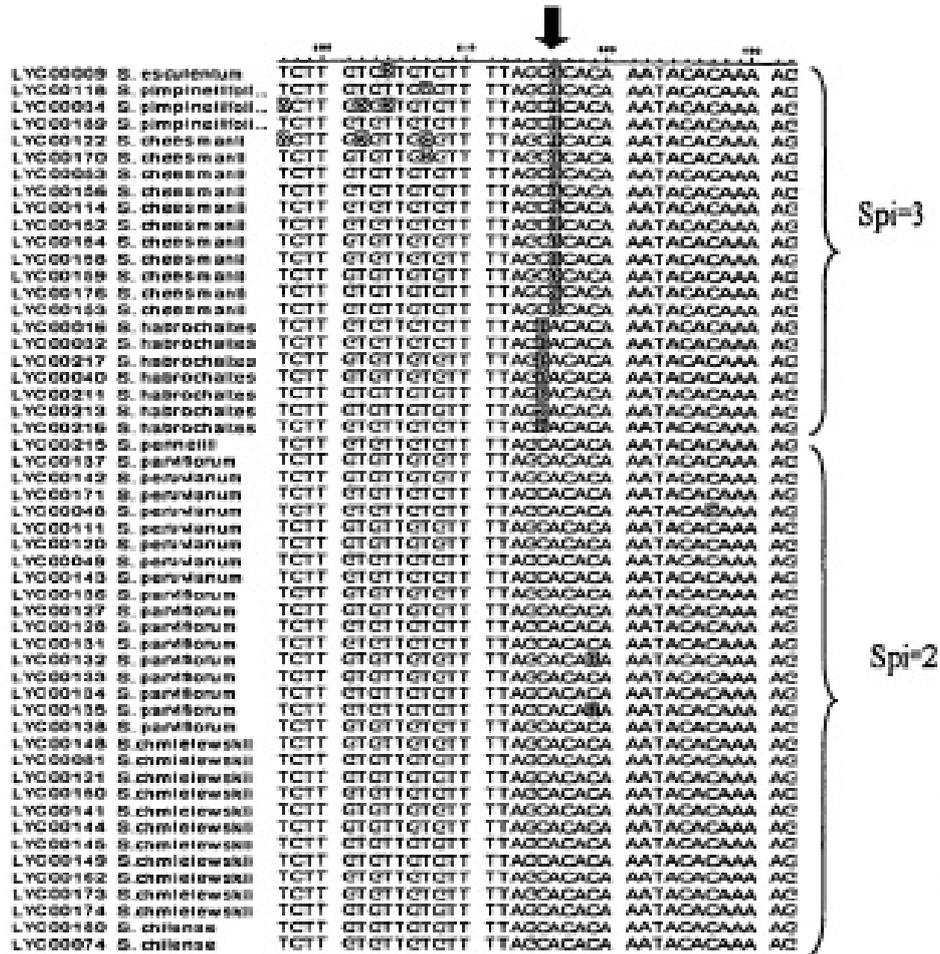


FIG. 5

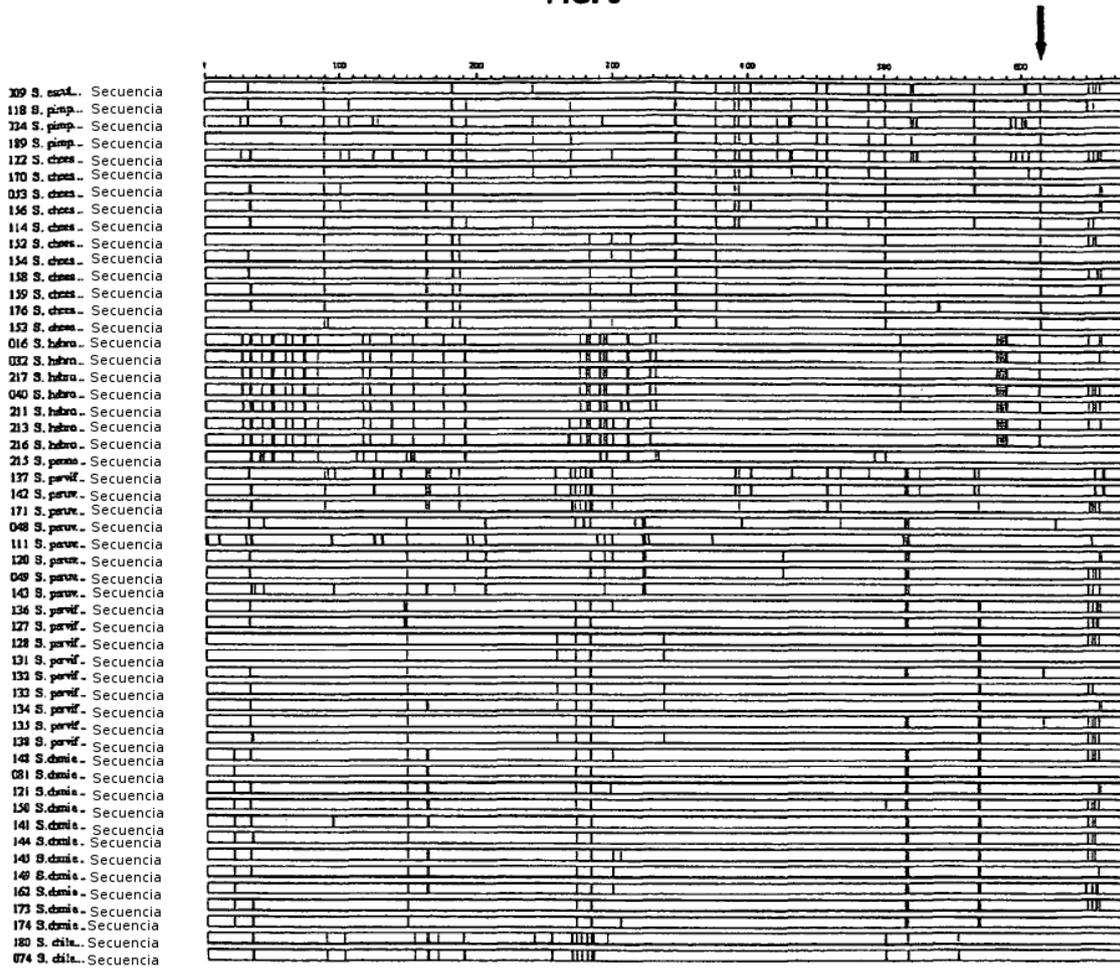


FIG. 6

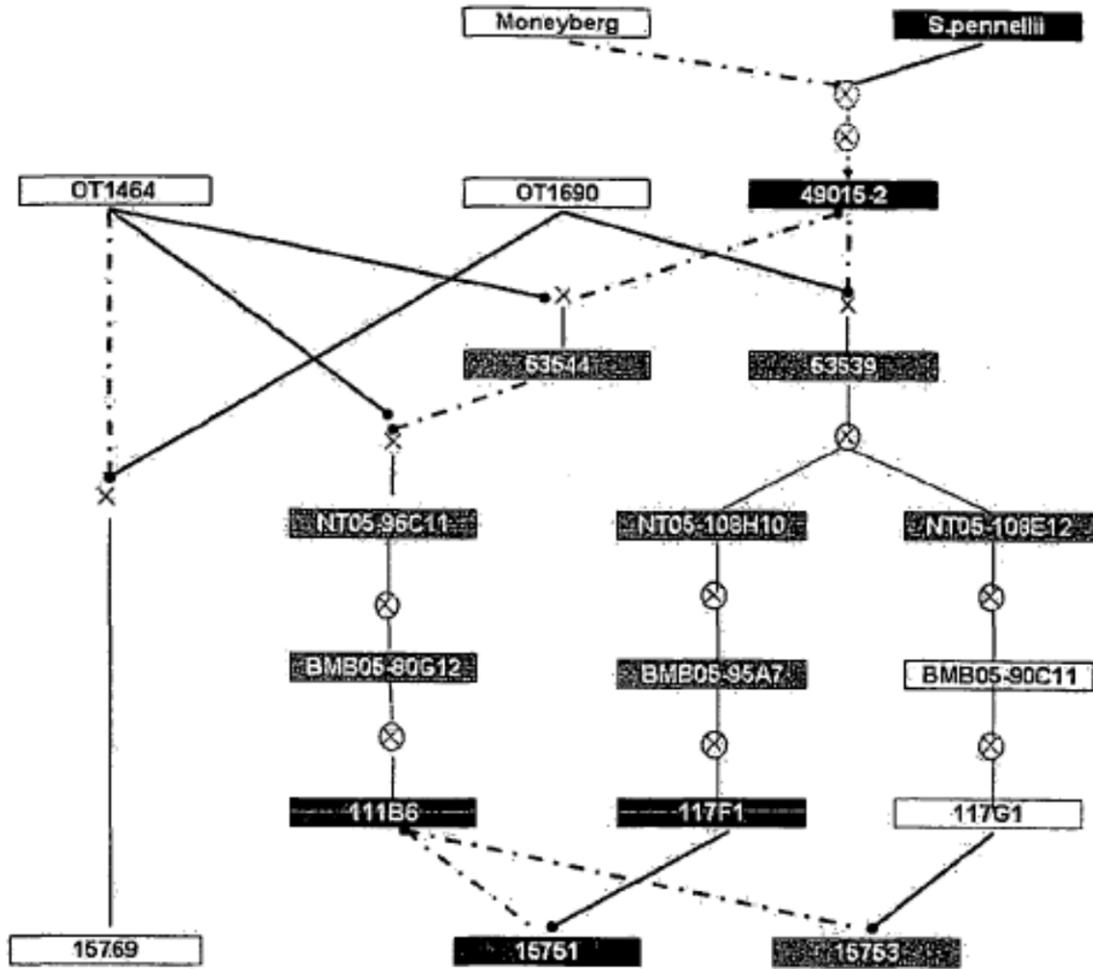


FIG. 7

Campo maestro	Genotipo	SPI	Nº de hojas 1 racimo	Nº de frutos	Peso de fruto (g)	Nº de frutos	Kg totales	Frutos/ racimo
15751	SP3Dpen/SP3Dpen	2,4	5,8	107	57	14	6,0	7,6
15753	SP3Dpen/SP3Desc	5,8	5,8	92	56	14	5,0	6,6
15769	SP3Desc/SP3Desc	7,5	7,5	56	59	9	9	6,7