

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 836**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2008 E 08712623 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2134877**

54 Título: **Determinación de las características de calidad en cultivos agrícolas y hortícolas**

30 Prioridad:

**20.02.2007 NL 1033431**

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

**27.08.2013**

73 Titular/es:

**EXPRESSIVE RESEARCH B.V. (100.0%)  
NIEUWE KANAAL 7B  
6709 PA WAGENINGEN, NL**

72 Inventor/es:

**DE BOER, ANNE DOUWE;  
EBSKAMP, MICHAËL JOHANNES MARCUS;  
GIERKINK, JOOST JOHANNES THEODORUS y  
LAROS, IVO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 420 836 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

Determinación de las características de calidad en cultivos agrícolas y hortícolas

5 La invención se refiere a la determinación de marcadores de las características de calidad y, en relación con los mismos, la determinación del tiempo de recolección óptimo y/o el recorrido óptimo posterior a la recolección de productos agrícolas y de hortícolas por medio de técnicas de biología molecular.

10 La determinación de la calidad de productos frescos agrícolas y hortícolas es cada vez más importante para los productores, la industria y los consumidores. La toma de conciencia de la importancia de la calidad aumenta de forma perceptible. Se han establecido requisitos rigurosos con respecto a la frescura, las características exteriores, el olor y el sabor del producto comestible. Con el fin de garantizar la calidad lo más posible, la industria ha introducido los sistemas denominados de "seguimiento y rastreo" en la cadena de producción. Con el fin de cumplir estos requisitos más rigurosos se optimiza el recorrido posterior a la recolección. Como resultado, las condiciones de transporte y almacenamiento cambian constantemente. Por tanto, los sistemas de pruebas que permiten la determinación objetiva de las características de calidad (parámetros de calidad) son una absoluta necesidad para determinar la calidad, declarar expectativas sobre la calidad futura o mejorar la calidad.

15 La calidad es una combinación de factores de calidad duros (se pueden medir fácilmente) y blandos (más difíciles de medir y a menudo aparentemente subjetivos). Los factores blandos, tales como la extensión del daño, el gusto, el olor o el aroma, la condición y la salud y el contenido de las alteraciones, en ocasiones se pueden determinar simplemente de forma subjetiva, pero suelen ser difíciles de cuantificar. Los factores duros, tales como el color, la acidez (pH), la firmeza, el contenido en azúcar, el tamaño o la longitud y el peso, a menudo se pueden determinar adecuadamente de forma cuantitativa. Algunos factores de la calidad, como el estado de latencia (profundidad del reposo) o la etapa de desarrollo solo son duros si se pueden medir cuantitativamente en base a, por ejemplo, marcadores moleculares que son determinativos de una etapa específica o de un estado específico. Los factores blandos solo son útiles si se les puede vincular a una escala cuantitativa. Esto se puede realizar, por ejemplo, estableciendo una comparación del parámetro de calidad con una serie de referencias, por ejemplo una referencia de buena calidad que se fija en 100% y una referencia de mala calidad que se fija en 0%. Por consiguiente, determinando un valor relativo con respecto a las referencias se obtiene una escala semicuantitativa para el valor de calidad de dicho parámetro. Los procedimientos en el mercado libre determinan, para los parámetros de calidad tanto blandos como duros, qué intervalo de valores es aceptable para ese parámetro de calidad específico y para ese producto agrícola u hortícola específico.

30 La calidad del producto se determina fundamentalmente mediante más de un parámetro de calidad y a menudo mediante muchos. No es preciso que en un momento concreto de tiempo, después de un tratamiento concreto posterior a la recolección, los valores de los diferentes parámetros de calidad estén todos en el intervalo óptimo determinado para dicho producto. Por ejemplo, un sabor óptimo no tiene que ir de la mano de un peso óptimo o un color óptimo. A menudo, la calidad total del producto es un compromiso de todos los valores de los factores de calidad. Es más, la calidad del producto depende del mercado deseado o del momento del año. Un producto se puede comercializar localmente de modo que son más relevantes otros factores de calidad que cuando el producto se almacena o se transporta. Asimismo, el intervalo que se considera óptimo para un parámetro de calidad puede ser diferente. No obstante, por parámetro de calidad, se puede indicar un intervalo de valores que se puede considerar óptimo para esa situación específica. No obstante, estos no son necesariamente los valores más óptimos en otra situación, ya que la calidad total del producto viene determinada por varios factores de calidad. En una situación específica, un parámetro de calidad concreto puede obtener una puntuación menor en cuanto que en una situación concreta otro parámetro es más importante, por lo que el valor más óptimo del primer parámetro no se puede efectuar en el mismo momento en el tiempo.

45 El recorrido posterior a la recolección tiene una gran influencia sobre los diferentes parámetros de calidad. El recorrido posterior a la recolección puede ser muy diverso según el tipo de producto agrícola u hortícola, la localización de la producción y/o la localización del mercado. Además, puede ser que el producto agrícola u hortícola se recolecte durante un periodo concreto del año y se venda en otros periodos durante el año, por lo que la duración del recorrido posterior a la recolección también varía. En el recorrido posterior a la recolección pueden estar implicados muchos tipos de almacenamiento, que varían desde el almacenamiento a temperatura ambiente, almacenamiento a temperatura reducida y, en ocasiones, incluso en ultracongelación. El almacenamiento o conservación puede implicar almacenamiento/envasado a atmósfera modificada/controlada, se pueden añadir inhibidores, tales como sustancias que contrarrestan la acción de ciertas hormonas vegetales. Todas estas medidas y condiciones en el recorrido posterior a la recolección afectan a los parámetros de calidad del producto agrícola u hortícola. Además, para diferentes cultivos de un producto agrícola u hortícola pueden ser relevantes diferentes parámetros de calidad o los valores óptimos pueden ser diferentes. El tiempo óptimo de recolección de un producto agrícola u hortícola depende considerablemente del recorrido posterior a la recolección y del parámetro de calidad que se esté considerando. Por tanto, para un producto específico, la ventana de recolección óptima (el periodo de tiempo durante el cual el producto recolectado proporciona los valores más óptimos para un parámetro de calidad concreto) en relación con un parámetro de calidad depende del recorrido posterior a la recolección que se va a escoger y de los criterios fijados por el mercado. Por consiguiente, en lo que respecta a la calidad total del producto o a un parámetro de calidad específico, no hay nada que sea una ventana de recolección óptima para todas las

situaciones. Por tanto, la ventana de recolección óptima se debería determinar de una situación a otra y, asimismo, de un producto (variedad cultivada o variedad) a otro (variedad cultivada o variedad). Por consiguiente, para el control de calidad es vital que se puedan predecir los parámetros de calidad más importantes después del recorrido posterior a la recolección en el momento o la recolección o durante el recorrido posterior a la recolección. A continuación, en base a esta predicción se puede determinar cuál es la ventana de recolección óptima para un producto agrícola u hortícola específico en un momento dado para una situación dada.

Para el producto específico fruto, se distinguen dos tipos de maduración de la fruta: el fruto que madura con la hormona etileno producida por la propia planta (fruto climatérico) y el fruto que es más o menos independiente de ella (fruto no climatérico). No obstante, en estudios recientes parece que esta división es arbitraria, ya que algunos tipos o variedades de frutos no cumplen esta clasificación y toman una forma intermedia (Golding y col., 2005, Stewart Postharvest Review 3:5). Durante la maduración, para los tipos de frutos climatéricos, hay un momento en el que realmente comienza la producción de etileno. El momento justo anterior a este, el preclimaterio, es, en términos fisiológicos, el momento óptimo de recogida. Sin embargo, este momento no necesariamente coincide con el momento óptimo para los parámetros de calidad comercial, tales como, por ejemplo, el tamaño del fruto, el dulzor deseado y el color. Si por estos motivos comerciales se prefiere un momento de recogida más tardío, tiene consecuencias directas sobre el mantenimiento de la calidad y el mantenimiento de la duración. En el caso del fruto no climatérico, actualmente el momento de la recogida viene determinado por, principalmente, parámetros de calidad comercial.

Después de recoger el fruto, generalmente se necesita algún tiempo para que el fruto esté maduro para su venta, es decir para que pueda ser consumido por el consumidor. Se necesita una gran parte de este tiempo para el transporte a un lugar en el que se procesa el fruto (p. ej., se envasa) y para el transporte desde ese lugar a los puntos de venta, por ejemplo el salón de ventas, y de ahí al minorista. Este es especialmente el caso si el fruto se va a transportar de un continente a otro, por ejemplo en el caso de las frutas tropicales. No obstante, durante este tiempo, el proceso de maduración continúa y a menudo sucede que la fruta cuando está lista para venderse está demasiado madura o, por el contrario, no está lo suficientemente madura para venderse. En el primer caso, la fruta no se puede vender o se puede vender a un precio más bajo, en el segundo caso la fruta se almacena hasta que ha madurado suficientemente. Por consiguiente, en ambos casos se sufren pérdidas económicas. El recorrido posterior a la recolección también influye considerablemente sobre el desarrollo de características negativas de la calidad, por ejemplo alteraciones tales como "hueco y marrón" o "cuellos débiles" en algunas variedades de pera.

Por consiguiente, el tiempo de recolección adecuado dependerá de los parámetros comerciales y el tiempo posterior a la recolección requerido para procesar y transportar la fruta. Sin embargo, el estado de la planta (tamaño, afectación por la enfermedad) y las condiciones climatológicas durante el desarrollo de la fruta (temperatura, cantidad de luz solar) o las condiciones del cultivo (por ejemplo, la extensión de la fertilización) son determinantes de los parámetros tanto fisiológicos como comerciales. Por consiguiente, nunca se puede dar un tiempo de recolección óptimo para todas las situaciones. Además, la determinación del tiempo de recolección óptimo es de gran importancia para el agricultor en relación con la planificación y despliegue de personal. Dado que en algunos casos, el responsable del desarrollo de alteraciones durante o después del almacenamiento no es el recorrido posterior a la recolección sino la historia anterior de la fruta, es de gran importancia poder medir dichos parámetros de forma objetiva.

La maduración de la fruta viene determinada por la degradación de la clorofila y la acumulación de pigmentos, el ablandamiento mediante cambios de textura producidos principalmente a la degradación de las paredes de las células, cambios en la acumulación de diferentes azúcares y ácidos orgánicos, de los que estos últimos determinan principalmente el gusto y la producción de sustancias volátiles que proporcionan el aroma. Se evalúa una fruta como "madura" si se encuentra en el estado en el que ha alcanzado un desarrollo suficiente de modo que tras la recolección y el posterior tratamiento la calidad sea, al menos, mínimamente aceptable para el posible consumidor (Reid, M.S., 1992, en: Peaches, Plums and Nectarines: Growing and Handling for Fresh Market., LaRue, J.H. y Johnson, R.S. (eds.), Univ. Calif. Dept. Agricult. Nat. Resourc. N° de publicación 3331, 21 - 28). Para determinar este momento y/o pronunciarse sobre la calidad prevista, se está buscando un índice de madurez adecuado. Durante los años, se han propuestos diferentes características de la fruta, a menudo externa, para que actuaran como tal. Crisoto describe, para las frutas con hueso, el uso de los parámetros "tamaño y forma", "dureza de la pulpa", "concentración de los sólidos solubles", "acidez" y "color" (Crisoto, C.H., 1994, Postharvest News and Inf., 5(6):65N-68N). Para las manzanas, Herrera menciona las características "color básico", "facilidad para coger", "dureza de la pulpa", "concentración de los sólidos solubles", "número de días transcurridos desde la floración", "enrojecimiento" y "color de las semillas" (Herrera E., 1998, <http://cahe.nmsu.edu/pubs/h/h314.html>). No obstante, en la práctica, dichos procedimientos han demostrado no ser útiles adecuadamente porque el respectivo índice de madurez no es lo bastante preciso o el índice no tiene apenas algún valor predictivo con respecto a la calidad prevista para determinados tipos o variedades de frutas.

Del producto específico tulipán (*Tulipa gesneriana*), los bulbos se cogen en los Países Bajos en primavera, en el momento en el que la profundidad de la latencia se considera óptima. Si la recolección se retrasa indebidamente, el suelo estará indebidamente mojado (por la lluvia), de modo que el riesgo de tener hongos aumenta considerablemente y las máquinas ya no pueden entrar en el campo. Es muy importante determinar con precisión cuál es la profundidad de la latencia en el momento de la recolección. La ventana de recolección la determina el

momento en el que la latencia es máxima y, en realidad, tiene solo un extremo dependiendo de las condiciones climatológicas. El parámetro de calidad que se ha de determinar en el momento de la recolección en este caso es la profundidad de la latencia. La latencia óptima garantiza un tamaño específico del bulbo, de modo que se puede obtener una longitud y espesor máximos del tallo de la flor tras el recorrido posterior a la recolección. Después de que la profundidad de la latencia haya alcanzado el máximo, el tamaño del bulbo ya no cambia. La longitud y el espesor del parámetro de calidad del tallo de la flor dependen de la profundidad de la latencia en el momento de la recolección; el momento óptimo, y asociados con el mismo, los mejores posibles valores de la calidad, se consigue si la profundidad de la latencia es máxima. En el presente documento, el momento del oscurecimiento del pelo en el exterior del bulbo se usa como indicador de que la profundidad de la latencia es máxima, pero en muchos casos esto parece poco fiable. En el presente documento es muy importante un buen marcador molecular con el que correlacionar el valor del parámetro de calidad longitud y anchura del tallo de la flor y a partir del cual se pueda obtener, en consecuencia, la profundidad de la latencia. En este caso, el recorrido posterior a la recolección para los bulbos de tulipán consiste en almacenar a temperatura más alta hasta que el punto de crecimiento en el bulbo ha cambiado desde la fase vegetativa a la fase generativa. Después, los bulbos se almacenan a una temperatura menor hasta que se ha alcanzado completamente la rotura de la latencia dependiente de frío. Por último, se produce el plantado del bulbo en tierra para maceta y su crecimiento (el tallo de la flor crece y, después, se produce la floración).

También son deseables pruebas moleculares para determinar cuándo el bulbo tiene suficiente frío sostenido para romper la latencia. Este es el momento en el que puede tener lugar el plantado. Una rotura insuficiente de la latencia por un periodo de frío demasiado corto también da una calidad peor. El parámetro de calidad de la longitud máxima del tallo de la flor que puede alcanzar también es importante en el presente documento. También en el presente documento, una vez más un periodo de frío más corto tiene como resultado una longitud menor del tallo de la flor. El parámetro de calidad a determinar en el recorrido final de la etapa posterior a la recolección es la extensión de la rotura de la latencia. Por tanto, el parámetro de calidad eventual de la longitud (y espesor) máxima del tallo de la flor en el tulipán depende de varios parámetros de calidad durante el recorrido posterior a la recolección, siendo el primero la profundidad de la latencia durante la recolección, después, la transición completa del punto de crecimiento en el bulbo de la fase vegetativa a la generativa y, por último, la rotura completa de la latencia mediante un periodo de menor temperatura. En otros cultivos de bulbos y de tubérculos, tales como lilas, dientes de león, jacintos, fresas, cebollas, ajos y amarillos, se producen problemas comparables para los que se requieren marcadores moleculares.

Para el producto específico flores cortadas, el momento de recolección con respecto a la maduración de la yema es de importancia para determinar el parámetro de calidad importante "la duración de la vida en el florero". Los marcadores moleculares durante la recolección, y especialmente los marcadores implicados en el envejecimiento de la flor y cuya extensión de la expresión génica o de la concentración de proteínas con la duración de la vida en el florero son buenos candidatos para usar en una prueba para la duración prevista de la vida en el florero. Durante el recorrido posterior a la recolección, el grado de estrés influye sobre la duración de la vida en el florero. Para casi todas las flores cortadas, incluidos el tulipán, la rosa, la alstroemeria, el lirio, la azucena, Dendranthema (crisantemo), la gerbera, el clavel, la fresa, Cymbidium y Gypsophila, es importante predecir una previsión de la duración en el florero con marcadores moleculares.

Para el producto específico, planta de maceta o planta de patio, el estrés tiene una influencia directa sobre el nivel del proceso del envejecimiento de la hoja. El envejecimiento de la hoja está relacionado directamente con el grado de amarilleamiento de la hoja. En el caso de las plantas de maceta, con mucha frecuencia la recolección no es la misma que recolectar, por ejemplo, frutas, a menos que esto se produzca a través de los brotes, sino que la recolección se caracteriza por la retirada de la planta de, por ejemplo, el invernadero, y el transporte al, por ejemplo, salón. Ahora casi todas las plantas de maceta y de patio, incluidas Pelargonium, Petunia, Dendranthema (crisantemo), Ficus, kalanchoë, Dracaena, Phalaenopsis, Hedera, Begonia, Spathiphyllum, Hydrangea y Euphorbia, es importante medir la calidad (relacionada con el estrés) con la ayuda de marcadores moleculares.

Para el producto específico pepino, la fase de maduración y el estrés tienen un efecto negativo sobre la calidad del pepino. Uno de los factores de calidad (negativos) para el pepino es el amarilleamiento del pepino. Para otros cultivos vegetales también, esta previsión de la calidad es de una gran importancia, por ejemplo para lechuga, endivia, apio, tipos de repollo, tales como brécol, coliflor, col china, col roja y otros tipos de col, y achicoria. Para cultivos vegetales que se venden en forma precortada, preenvasada o no preenvasada, es también de importancia, después de cortar, medir el efecto del estrés sobre el envejecimiento mediante marcadores moleculares para controlar de este modo la calidad del producto cortado.

Para el producto específico uva, la composición de las sustancias producidas en la uva en un momento concreto es de gran importancia para la calidad del producto (vino, vino de Oporto, champán y similares). El parámetro de calidad del gusto de, por ejemplo, el vino de oporto se puede cuantificar mediante, por ejemplo, un panel de sabor. La correlación del gusto con el nivel de marcadores moleculares en el momento de la recolección, o durante el recorrido posterior a la recolección, es importante reconocer la calidad del producto final ya en una etapa precoz. Esto también es cierto para otros cultivos, como hierbas y especias, tipos específicos de bayas, por ejemplo olivas y bayas de enebro, y otros productos agrícolas u hortícolas en los que la presencia de componentes determinantes del gusto pueden determinarse mediante marcadores moleculares de modo que la calidad del gusto del posible producto

se pueda predecir.

Las técnicas de biología molecular, tales como análisis del genoma y del transcriptoma, se han usado a gran escala en los últimos años para investigar todos los tipos de procesos que desempeñan un papel en la calidad del producto. Por ejemplo, se han investigado adicionalmente los procesos implicados en la maduración de la fruta y se han realizado esfuerzos para identificar las enzimas que desempeñan un papel en ellos (véase, entre otros, Golding J.B. y col., 2005, Brummell, D.A., 2005, y Owino, W.O. y col., 2005, todos en: Stewart Postharvest Review 3:5). Los resultados tratados en los artículos de revisión mencionados en lo que antecede se han usado principalmente para influir en los diferentes procesos, entre los cuales el proceso de maduración, por ejemplo creando plantas transgénicas con sobreexpresión o expresión bloqueada de ciertos genes que codifican enzimas que supuestamente desempeñan un papel en el proceso. No obstante, hasta ahora, todavía no se han usado técnicas de biología molecular para predecir el valor previsto de un parámetro de calidad o para determinar la ventana de recolección óptima para una situación dada.

La invención se refiere a un procedimiento necesario para identificar y aislar marcadores moleculares, genes o proteínas, para los que el valor de la actividad génica o de la concentración de proteínas, respectivamente, en un momento concreto durante la recolección o durante el recorrido posterior a la recolección se correlaciona con un parámetro de calidad específico en un momento específico, y el procedimiento para predecir después de la medición del valor de este marcador durante la recolección o durante el recorrido posterior a la recolección, el valor del parámetro de calidad durante la recolección, el recorrido posterior a la recolección o al final del recorrido posterior a la recolección o la previsión de una situación específica.

## **Descripción de las figuras**

Fig. 1. Evolución de la maduración con el tiempo con la pera cv. Bon Chretien en cinco huertos. En el diagrama se representa un valor medio de la totalidad de los marcadores usados ( $\beta$ xyl, PG y peroxidasa 424/87) frente al tiempo en días.

Fig. 2 a. Correlación de la expresión génica del marcador 1 (PG1) durante la recolección y la dureza en el mercado para la pera cv Bon Chretien. b. Correlación de la expresión génica del marcador 6 (424/87) después de un almacenamiento corto y la dureza en el mercado. En el eje x se indica la dureza al final del almacenamiento (la presión en N/m<sup>2</sup> requerida para oprimir la fruta) y en el eje y se indica logarítmicamente el nivel de expresión del marcador. La línea vertical indica el valor marginal de la dureza todavía aceptable para el mercado al que está destinada.

Fig. 3 a. Correlación de la expresión génica del marcador 6 ( $\beta$ xyl) durante la recolección y la dureza en el mercado para la pera cv Forelle. b. Correlación de la expresión génica del marcador 1 (PG1) tras el almacenamiento corto y la dureza en el mercado. En el eje x se indica la dureza al final del almacenamiento y en el eje y se indica logarítmicamente el nivel de expresión del marcador.

Fig. 4. Evolución de la maduración con el tiempo con manzana cv. Granny Smith en cinco huertos. En el diagrama se representa un valor medio de la totalidad de los marcadores usados ( $\beta$ xyl y PG) frente al tiempo en días.

Fig. 5 a. Correlación de la expresión génica de  $\beta$ xyl durante la recolección y la dureza en el mercado para la manzana cv Granny Smith. b. Correlación de la expresión génica del marcador  $\beta$ xyl después de un almacenamiento corto y la dureza en el mercado. En el eje x se indica la dureza al final del almacenamiento y en el eje y se indica logarítmicamente el nivel de expresión del marcador.

Fig. 6. Evolución de la maduración con el tiempo con manzana cv. Golden Delicious en cinco huertos. En el diagrama se representa un valor medio de la totalidad de los marcadores usados ( $\beta$ xyl y PG) frente al tiempo en días.

Fig. 7. Correlación de la expresión génica del marcador M8 (actina) después de un almacenamiento corto y la dureza en el mercado. En el eje x se indica la dureza al final del almacenamiento y en el eje y se indica logarítmicamente el nivel de expresión del marcador. La línea vertical indica el valor marginal de la dureza todavía aceptable para el mercado al que está destinada.

Fig. 8. Se obtuvieron muestras de la variedad cultivada de manzana Kanzi cada semana durante la temporada 2006 y 2007. En el eje x se indica el número de días respecto al momento de recolección óptimo (determinado con parámetros fisiológicos). En el eje y se indica el nivel de expresión de la beta-xilosidasa.

Fig. 9. Manzana cv. Kanzi, marcadores de la pulpa durante la recolección frente a la firmeza al final del almacenamiento (EOS). La expresión del marcador se representa contra la firmeza de la manzana en kilogramos. En el panel A para el marcador PG, en el panel B para el marcador beta-xilosidasa.

Fig. 10. Marcadores de la pulpa de la pera cv, Conferencia durante la recolección frente a la firmeza al final del almacenamiento (EOS). La expresión del marcador se representa contra la dureza de la pera en kilogramos. En el panel A para el marcador PG, en el panel B para el marcador beta-xilosidasa.

Fig. 11. Expresión (en el eje y) de GAST en tulipán en relación con el momento de recogida. En el eje x se indica el número de días desde el momento óptimo de la recogida. Se representa el patrón de expresión de GAST en 4 años de la cv Apeldoorn y la cv Prominence.

5 Fig. 12. Marcador de calidad para la duración en el florero de la rosa. Expresión (en el eje x) del lipasa con motivo GDSL en rosas con una duración en florero de 5,7 días y una duración en florero de 8,0 días. La expresión del marcador es menor en las rosas de calidad de conservación buena que en las rosas de calidad de conservación mala. La recolección es el momento directamente después de cortar, el almacenamiento es a 4°C en agua, durante 1 día y durante 4 días.

### **Descripción detallada de la invención**

10 A continuación se explica la invención con detalle para determinar la previsión (o predicción) de la maduración y/o el momento de la recolección de la fruta, en concreto de manzanas y peras. Naturalmente, la tecnología general también es útil para determinar marcadores de características de calidad y, relacionados con esto, determinar el tiempo óptimo de recolección de los productos agrícolas y de horticultura aparte del fruto.

15 La maduración del fruto es un proceso mediante el cual se degrada la clorofila y comienzan a formarse pigmentos, mientras que el fruto pierde su dureza, mediante el cual se forman azúcares y ácidos orgánicos y mediante el cual se forman sustancias aromáticas volátiles.

20 Estas actividades necesitan que ciertos procesos bioquímicos en las células de la fruta se enciendan o se apaguen. Uno de los cambios más estudiados en el metabolismo es la producción y los efectos del etileno, que desempeña una parte principalmente en las frutas climatéricas (por ejemplo, tomate, melón, manzana, aguacate, kiwi y plátano). En estas frutas, el etileno es un requisito previo para la maduración porque actúa como una hormona que puede activar los factores de transcripción que, a su vez, influyen sobre la expresión génica en la célula (la denominada vía de señalización del etileno).

25 Parece, *inter alia*, a partir de la presente invención, no obstante, dichos genes *inter alia* implicados en la textura de la fruta podrían, en principio, ser un parámetro adecuado para determinar la previsión de la maduración y el tiempo de recogida adecuado para la fruta. No obstante, a partir de la bibliografía citada anteriormente y de los ejemplos que se presentan a continuación en el presente documento se puede concluir que es preferible examinar varios índices de maduración durante la maduración de la fruta. Los genes que están implicados en los cambios en la dureza de la fruta y que son aptos para la investigación son, entre otros:  $\beta$ -xilosidasa ( $\beta$ xyl), poligalacturonidasa I y II (PGI y PGII), peroxidasa supuesta de la pared celular 424/87 (87), endotransglucosilasa de xiloglucano (XET), marcador M8 de la actina, expansina y glucanasas tales como endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, D-sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP y/o alfa amilasa.

35 La esencia de la invención es, primero, desarrollar una línea de calibración para cada variedad, de modo que se sigue la expresión de los genes mencionados anteriormente (con respecto a la maduración de la fruta) u otros genes (con respecto a otros parámetros de calidad mencionados anteriormente en el presente documento) durante la evolución del proceso de maduración. En el presente documento se puede determinar cuál de los genes mencionados anteriormente posee la mejor correlación con una característica de calidad después de este recorrido, en otras palabras qué genes serán mejores determinantes de la previsión con respecto al valor de esta característica de calidad. Parece que durante la maduración, en cualquier caso con algunas de las variedades de frutas analizadas, como se muestra en los ejemplos, en un momento dado, diferentes genes dan la mejor correlación con, en este caso, la característica de calidad dureza.

40 Determinación de los perfiles de expresión de genes y proteínas.

45 Para obtener resultados y pruebas fiables es importante que la obtención de la muestra se realice de un modo reproducible. En el presente documento, "la determinación de un perfil de expresión" de los genes se usa como es habitual en el campo de la tecnología y se refiere a un procedimiento para medir el estado transcripcional (ARNm) o el estado traduccional (proteína) de uno o más genes en una célula. Para aislar el ARNm y las proteínas de las plantas se pueden usar protocolos estándar disponibles. En una serie de casos estos requerirán pequeñas modificaciones si el tejido tiene una pared celular muy espesa o contiene muchos azúcares. Estos protocolos y modificaciones son parte de los conocimientos del experto en la técnica. Dependiendo del procedimiento usado, dichas mediciones pueden abarcar una determinación amplia de genoma de la expresión, y también la medición de únicamente el perfil de la expresión de algunos genes, lo que tiene como resultado la realización de un "perfil de expresión génica" o un "perfil de expresión", términos que se utilizarán como tales a continuación. Un "perfil de expresión" comprende uno o más valores que están relacionados con una medición de la presencia relativa de un producto de expresión génica. Dichos valores comprenden mediciones de los niveles de ARN o las concentraciones de proteínas. Por tanto, el perfil de expresión puede comprender valores que representan la medición del estado transcripcional o del estado traduccional del gen. Con respecto a esto, se hace referencia a las patentes de EE.UU. N° 6.040.138. 5.800.992. 6.020.135. 6.344.316 y 6.033.860.

60 El estado traduccional de una muestra comprende la identidad y la aparición relativa de los ARN, en concreto los ARNm, presentes en la muestra. Preferentemente se mide un número suficiente de genes para determinar el estado transcripcional de la muestra. El estado transcripcional también se puede determinar adecuadamente midiendo la presencia del transcrito mediante cualquiera de las tecnologías de expresión génica existentes.

El estado traduccional comprende la identidad y la aparición relativa de las proteínas constituyentes en la muestra. Aquí también, bastará con un número suficiente de proteínas para determinar el estado traduccional de la muestra. Como saben los expertos en la técnica, a menudo el estado transcripcional y el estado traduccional se correlacionan. Cada valor en los perfiles de expresión, determinados y medidos en la presente invención, es una medición que representa la expresión absoluta o relativa de un gen. Los niveles de expresión de estos genes se pueden determinar mediante cualquier procedimiento conocido en el campo para determinar el nivel de un ARN o de una proteína en una muestra. En primer lugar se tienen que analizar los perfiles de expresión de un gran número de genes. Las técnicas que se pueden usar para esto son secuenciación directa: tal como secuenciación del transcriptoma (Roche & 454 Sequencing); perfiles digitales como Clonal Single Molecule Array™ (Solexa); se usa Northern electrónico para calcular los niveles de expresión génica en diferentes muestras y se basa en el número de secuencias para un gen específico que se identifican en un conjunto de bibliotecas de ADNc. Variaciones de estos son análisis en serie de la expresión génica (SAGE), unión en matriz en tándem de marcadores de secuencia expresada (TALEST) y AFLP (polimorfismo de longitud del fragmento amplificado) de ADNc, todos los cuales permitirán la detección de transcritos expresados de forma diferencial.

Además, existen técnicas para determinar la presencia de transcritos mediante hibridación, tales como micromatrices. Dicha micromatriz puede ser una matriz de ADN, una matriz de oligonucleótido o, en términos generales, una matriz de ácido nucleico. El experto en la técnica podrá obtener matrices autodiseñadas y equipo de lectura de matrices asociado procedente de proveedores especializados (por ejemplo, Affymetric Corp., Santa Clara, CA, EE.UU.).

Para monitorizar un número menor de transcritos, se puede usar: análisis de tipo Northern, esta es una de las técnicas estándar para detección y cuantificación de los niveles de ARNm. Con esta técnica, se puede detectar el tamaño del ARNm y cualquier corte y empalme alternativo y familias de múltiples genes. Con la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) se pueden detectar moléculas de ARNm con una elevada sensibilidad porque tiene lugar una amplificación exponencial de los transcritos, técnica que también se denomina PCR cuantitativa. Esta técnica es particularmente adecuada para una cuantificación altamente precisa de los transcritos de ARNm. Dado que con esta técnica se puede analizar un número muy elevado de muestras y esta técnica puede ser también automática (Applied Biosystems 7900HT system Foster City, EE.UU.), en la actualidad se prefiere para analizar los transcritos. Además, también se pueden usar otras plataformas tecnológicas, tales como la tecnología PAMChip® (Pamgene, Den Bosch, Países Bajos) o la tecnología BioTrove OpenArray™ (BioTrove Inc., Woburn, EE.UU.). El fabricante también puede proporcionar conocimientos sobre la operación de las respectivas plataformas en caso de que el experto no esté familiarizado con una plataforma específica.

En estas tecnologías, la presencia de un gen marcador concreto viene determinada por la amplificación selectiva de este gen. Esto se realiza, en general, con la ayuda de cebadores. En general, el término “cebadores” hace referencia a hebras de ADN que pueden iniciar la síntesis de ADN. La ADN polimerasa no puede sintetizar *de novo* ADN sin cebadores. Solo puede alargar una hebra de ADN existente en una reacción en la que la hebra complementaria se usa como molde para dictar el orden secuencial de la cadena de nucleótidos que se va a componer. Los cebadores sirven para proporcionar la ADN polimerasa un punto de partida para la reacción de amplificación. En consecuencia, los cebadores son, en general, cadenas de nucleótidos cortos (oligonucleótidos) con una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos. Estos cebadores son complementarios de la secuencia génica que se va a amplificar y, por tanto, se presentarán en forma monocatenario a ADN o ARN monocatenario, forma de cadenas nucleotídicas dúplex con la secuencia diana mediante hibridación. Idealmente, para la hibridación, se requieren cadenas nucleotídicas exactamente complementarias, pero parece que también se efectúa una hibridación suficiente si no todos los nucleótidos son complementarios, los denominados “errores de apareamiento”. Además de la extensión de la complementariedad, la capacidad de los cebadores para hibridar con la secuencia diana también tiene que ver con las condiciones de reacción en las que tiene lugar la hibridación.

Amplificación de ADN: La expresión amplificación de ADN se utilizará para indicar la síntesis *in vitro* de las moléculas de ADN bicatenarias con la ayuda de la PCR o un sistema de amplificación comparable. Las amplificaciones requeridas para la presente invención pueden usar varios procedimientos de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Mullis 1987, patente de EE.UU. N° 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159) o la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Barany 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193; solicitud de EP n° 320,308), replicación de la secuencia autosostenida (3SR; Guatelli y col., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA; patente de EE.UU. N° 5.270.184, y 5.455.166), Transcriptional Amplification System (TAS; Kwoh y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi y col., 1988, Bio/Technology 6:1197), amplificación por círculo rodante (RCA; patente de EE.UU. N° 5.871.921), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), polimorfismo de longitud de fragmento con Cleavase (patente de EE.UU. N° 5.719.028), amplificación iniciada por cebador isotérmica y quimérica de ácido nucleico (ICAN), método de amplificación de extensión-ramificación (RAM; patente de EE.UU. N° 5.719.028 y 5.942.391) u otros procedimientos adecuados para la amplificación de ADN. Para amplificar el ADN con un número menor de errores de apareamiento con respecto a los cebadores de amplificación, se puede llevar a cabo una reacción de amplificación en condiciones de rigurosidad reducida (en otras palabras, una reacción de PCR usando una temperatura de hibridación de 38 °C o en presencia de MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM) El experto en la técnica podrá seleccionar las condiciones adecuadas de rigurosidad.

- El hecho de que se permita un pequeño número de errores de apareamiento en los cebadores significa que un cebador para una secuencia diana determinada se puede usar en determinaciones de varios tipos de organismos. Esto es porque diferentes organismos, en concreto diferentes especies e incluso diferentes variedades en una especie, suelen exhibir diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus proteínas y/o en las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican estas proteínas. Al permitir en el presente documento diferencias pequeñas, se puede usar uno y el mismo cebador para la determinación en varios organismos. En los ejemplos se muestra, por ejemplo, que los cebadores son eminentemente adecuados para determinar los genes marcadores y/o “genes domésticos” en diversas variedades dentro de una especie (por ejemplo, manzana) e incluso para diferentes especies (manzana y pera).
- Se calculan los niveles de transcripción relativos en relación con los controles adecuados, que están presentes en la muestra. Dichos controles son, por ejemplo, genes expresados de forma constitutiva, tales como, por ejemplo, enzimas “domésticas” concretas. Particularmente preferidos son los marcadores constitutivos fosfoglicerato quinasa (PGK, EC 2.7.2.3) o factor de elongación 1 $\alpha$  (eF1 $\alpha$ ), véanse también los Ejemplos.
- Además, los perfiles de expresión se pueden determinar en base a los perfiles de proteínas. También en el presente documento, para la detección se usarán inicialmente técnicas con las que se puedan examinar simultáneamente muchos perfiles proteicos. Un ejemplo de los mismos es la electroforesis en gel. En el presente documento, las proteínas se separan primero en base a su peso molecular. Opcionalmente, después de esto, puede tener lugar una segunda separación para una segunda dimensión (2D) en base al punto isoeléctrico de las proteínas (gradiente de pH). Después, la secuencia de aminoácidos de las proteínas expresadas de forma diferencial se puede determinar con la ayuda de la espectrografía de masas. Otra técnica para examinar muchas proteínas de forma simultánea es el uso de las denominadas matrices proteicas (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA, USA), de modo que se puede cuantificar la cantidad de muchas proteínas diferentes y de péptidos proteicos. También en el presente documento, con la ayuda de la espectrografía de masas se puede determinar la secuencia de aminoácidos de las proteínas. En esta realización, los valores en el perfil de la expresión se obtienen midiendo la concentración de los productos proteicos de los genes marcadores. La concentración de estos productos proteicos se puede determinar mediante el uso de, por ejemplo, anticuerpos específicos para estos productos proteicos. El término “anticuerpo”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina o una parte inmunológicamente activa de la misma, es decir una parte de unión a antígeno. Ejemplos de partes inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina son, por ejemplo, fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub>, que se pueden generar tratando el anticuerpo con una enzima como la pepsina. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, monoclonal, recombinante y, por ejemplo, uno quimérico o “monocatenario”. La detección del producto génico se ve facilitada mediante el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable (es decir, marcaje del anticuerpo). Ejemplos de sustancias detectables son, entre otras, varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas son, entre otras, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa y acetilcolinesterasa; ejemplos de grupos prostéticos adecuados son, entre otros, estreptavidina o avidina y biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados son, entre otros, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es, entre otros, luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes son, entre otros, luciferasa, luciferina y acurina; y ejemplos de materiales radiactivos adecuados son, entre otros, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S y <sup>3</sup>H.
- Actualmente, la detección de proteínas tiene lugar principalmente con la ayuda de anticuerpos y, para este fin, se dispone de diferentes sistemas de detección tales como ensayos de flujo lateral, pero también de equipo de detección que usa quimioluminiscencia, tal como el GeneGnome (Syngene, Cambridge, Reino Unido). También es posible medir la interacción directa entre anticuerpo y proteína con, por ejemplo, los sistemas Biacore™ (Biacore AB Corp., Uppsala, Suecia) o IBIS iSPR (IBIS technologies, Hengelo, Holanda) o partículas paramagnéticas (solicitud de patente europea nº 0040744572). Dependiendo del número de marcadores proteicos, el experto en la técnica podrá seleccionar la mejor plataforma de detección. El fabricante también puede proporcionar conocimientos sobre la operación de las respectivas plataformas en caso de que el experto no esté familiarizado con una plataforma específica.
- En principio, para cualquier característica de calidad que se pueda determinar de forma objetiva se puede realizar una línea de calibración sobre la cual se pueda representar la expresión de marcadores (ARNm o proteínas) frente a la característica de calidad. Esto se puede realizar antes, durante o después de la recolección. En base a la correlación de los marcadores con la característica, se determina para un periodo concreto de tiempo qué marcador o marcadores se correlaciona más (y, por tanto, es más fiable como predictor). Las características de calidad que se pueden considerar son, por ejemplo: la dureza de la fruta, la rotura de la latencia en los cultivos de bulbos y la duración de las flores cortadas en el florero, y otros parámetros mencionados en la introducción. Por supuesto, es importante mantener las condiciones antes y después de la recolección lo más iguales posible a las condiciones que se usarán más adelante. Se entenderá que, por ejemplo, una línea de calibración realizada con la fruta almacenada a 4°C no será la misma que la línea de calibración realizada con la fruta almacenada 20°C o a temperatura ambiente. No obstante, una línea de calibración realizada a 4°C se puede usar para predecir la maduración prevista de la fruta a otras temperaturas porque la expresión medida indica la extensión de la maduración. Por consiguiente, se produce inexactitud ya que no se puede derivar de la línea de calibración para el tiempo de almacenamiento que se sigue necesitando en esas otras condiciones (porque la velocidad de la maduración es diferente). Por tanto, es

preferible una línea de calibración que sea específica para una situación concreta. La línea de calibración deberá indicar cuándo se espera que un producto cumpla un criterio de calidad dado. Esto puede significar que, por ejemplo, los marcadores den una previsión alrededor del periodo de tiempo que se puede almacenar la fruta en condiciones de refrigeración o durante cuánto tiempo necesitarán frío los bulbos antes de romper su latencia. Naturalmente es importante, cuando las muestras no están todavía en un ambiente controlado, obtener muestras con regularidad y determinar el perfil de expresión para ajustar y optimizar la previsión. Ya que puede que las muestras se desarrollen más rápido o, por el contrario, más despacio, en las base de las condiciones. De hecho, una línea de calibración basada en la nueva situación se haría más inclinada o más plana. Se entenderá que una línea de calibración realizada en base a la maduración de una fruta durante un verano seco y caluroso no dará una predicción precisa sobre la duración prevista de la maduración en un verano húmedo y fresco. No obstante, dado que, como ya se ha mencionado en relación con las variaciones en las condiciones de almacenamiento, los valores de expresión medidos sí indican la condición de maduración de la fruta, se puede determinar en base a una comparación con la línea de calibración si la fruta está madura para su recogida. Como parece también a partir de los ejemplos, para características de calidad concretas ya se han realizado líneas de calibración.

En flores cortadas, mediante una combinación de un marcador de la senescencia de la flor y un marcador del grado de estrés, ambos se correlacionan con la duración de la flor en el florero durante el recorrido posterior a la recolección, se puede predecir la duración en el florero. A este respecto, se puede usar una cisteína proteasa y una lipasa co motivo GDSSL.

Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, con las plantas de maceta, el amarilleamiento de las hojas es un importante parámetro de calidad. Durante la recolección o durante el recorrido posterior a la recolección, este parámetro de calidad negativo (que depende directamente de la edad de la hoja) se puede predecir con marcadores implicados en el proceso de envejecimiento de la hoja, que se correlacionan con la extensión del amarilleamiento de la hoja, opcionalmente en combinación con marcadores con una expresión más alta en las hojas más viejas que en las hojas más jóvenes y que se correlacionan con la extensión del amarilleamiento de la hoja. El parámetro de calidad "amarilleamiento" en el pepino se puede predecir de un modo comparable al de las plantas de maceta mediante marcadores moleculares durante la recolección o durante el recorrido posterior a la recolección.

De un modo similar, con uvas, si se puede dar al sabor un valor de calidad que sea reproducible, el sabor se puede predecir durante la recolección o durante el recorrido posterior a la recolección usando una combinación de marcadores implicados en la biosíntesis de los componentes del sabor y cuya expresión génica se correlaciona con el grado de sabor.

Además de ser aplicable a los tipos de frutas mencionados en los ejemplos, la presente invención de determinar marcadores de la maduración y el momento de la recolección y de predecir las características de calidad previstas también es aplicable a todos los tipos de frutas para los que el momento de la recolección y la duración después de la maduración son factores importantes para que puedan ser consumidas y para las condiciones económicas sobre la disponibilidad de la fruta (transporte, almacenamiento). Además de usar para manzanas y peras, la invención puede usarse adecuadamente para los siguientes tipos de frutas: frutos cítricos, tales como naranja, mandarina, limón y naranja de tipo mineola, melón, tomate, melocotón, ciruela, uva, grosella, grosella silvestre, mora, frambuesa, cereza, piña, mango, kiwi, lichi, plátano, pimentón y aguacate, incluidas todas las variedades y variedades cultivadas de los mismos.

Además, la invención es aplicable a todos los cultivos agrícolas y de horticultura cuya calidad se determina, en gran medida, mediante el momento de la recolección y el recorrido posterior a la recolección. Ejemplos de cultivos que cumplen este criterio son las flores cortadas, las plantas de maceta decorativas, las plantas bulbosas y los pepinos ya mencionados en la introducción, pero también prácticamente todos los demás tipos de hortalizas y granos, tales como, por ejemplo, lechuga, patata, alfalfa, espárrago, tapioca, batata, todos los tipos de repollos (coliflor, col de hoja rizada, coles de Bruselas, col de Milán, col cónica y similares), achicoria, zanahorias (baby), zanahorias de invierno, legumbres, trigo, maíz, arroz, avena, cebada y plantas que se usan como hierbas, por ejemplo pimienta, eneldo, perifollo, romero etc. Asimismo, la invención es aplicable a cultivos que no se consumen como tales pero que se usan para la producción de productos comercialmente importantes, tales como, por ejemplo, frutos de la palma de aceite, olivas, caña de azúcar, remolacha azucarera, girasoles, soja, semillas de café, semillas de cacao, plantas productoras de madera y todos los cultivos mencionados en el sitio web de la Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations (<http://www.fao.org/> en <http://faostat.fao.org>)

Aplicación práctica de los marcadores de ensayo en las muestras.

Los marcadores se pueden analizar en un laboratorio de aplicación (externo) o en el centro en un ambiente simple (laboratorio).

Al enviar las muestras a un laboratorio de aplicación existen varias posibilidades. Una primera posibilidad es que las muestras lleguen intactas al laboratorio de aplicación. Esto se puede realizar con, por ejemplo, fruta (intacta). Siempre que las condiciones de transporte no sean extremas (diferencias de temperatura, presión en las muestras etc.), el transporte no afectará al resultado de las pruebas. Tras la llegada al laboratorio de aplicación, las muestras han de fijarse lo antes posible, por ejemplo congelando en nitrógeno líquido, o procesarse inmediatamente para su posterior análisis. En el caso de que haya un número elevado de muestras, la obtención de la muestra, extracción y

detección se puede automatizar con un robot.

La segunda posibilidad es probar las muestras in situ. El número de etapas y la complejidad de las operaciones tendrán que limitarse para que la prueba pueda ser realizada por personas menos formadas. En la primera etapa se tendrá que tomar la muestra. En algunos casos, esto puede implicar el producto entero, pero en la mayoría de los casos implica una porción del producto. En el caso de una porción del producto, esta porción tiene que ser representativa del producto entero. Por tanto, por ejemplo, se puede optar por una parte de la pulpa o una parte de la hoja o de la flor. Por tanto, en el caso de una fruta, se puede tomar un pedazo de piel o un cubito de pulpa para realizar la prueba. Si la prueba es para relacionar la calidad de un lote completo del producto respectivo, se tendrá que tomar del lote una muestra aleatoria representativa. El tamaño de la muestra aleatoria en relación con el tamaño del lote determinará la fiabilidad. Para determinar el tamaño de la muestra aleatoria que se necesita para una fiabilidad concreta se puede obtener procedimientos de cálculo estadístico de la bibliografía especializada. Después, en base a la muestra aleatoria se puede obtener una muestra mixta o se pueden realizar varias pruebas con cada muestra del producto. La determinación individual de cada muestra también permite la determinación de la extensión en el lote. Después de esto, el material se tendrá que fijar y extraer. Esto se puede realizar moliendo, presionando o rompiendo la pared celular con una combinación de sustancias químicas (p. ej., tampones) que garantizan que los marcadores de la muestra no se degradan. Esto puede implicar, por ejemplo, papel FTA (Whatman International Ltd., Inglaterra), pero también puede implicar tampones con inhibidores de proteinasa o de RNAasa. La elección dependerá del tipo de muestra y podrá realizarla el experto en la técnica. Para los marcadores proteicos, normalmente se necesitarán otros materiales distintos que para los marcadores de ARN. En algunos casos, se tendrá que realizar primero una purificación de los marcadores, en otros casos será posible realizar una detección directa de los marcadores. Muy adecuados para la detección rápida de proteínas son las pruebas de flujo lateral, dirigidas contra las proteínas que se van a detectar usando anticuerpos (GenScript Corp. Piscataway, NJ, US; BioGenes GmbH Berlín, Alemania). Estas pruebas se pueden realizar fácilmente (Whatman International Ltd., Inglaterra) y esta tecnología ya está comercializada, por ejemplo en las pruebas de embarazo que puede adquirir el consumidor.

La invención, en otra realización, también comprende kits para detectar y predecir las características de calidad previstas en la fruta, por ejemplo la dureza de la fruta, o predecir la ventana de recolección prevista o determinar el momento adecuado para recoger la fruta. Dicho kit será específico para una variedad concreta de fruta e incluirá medios para la detección cuantitativa de los genes, predeterminados para dicha variedad de fruta, que son predictivos del valor previsto de la característica de calidad, junto con líneas de calibración del patrón de expresión de los genes correspondientes para dicha variedad concreta de fruta, de modo que el patrón de expresión medido se pueda comparar con las líneas de calibración y en base a las mismas se puede realizar una producción del momento de maduración restante previsto y, por tanto, también se puede realizar una predicción del tiempo previsto de recogida. Estas líneas de calibración también se pueden incluir en un sistema automático de modo que los valores que se generan mediante la medición del perfil de expresión automáticamente se representan sobre estas líneas de calibración y, como resultado, se da la predicción del valor previsto de la característica de calidad. Este proceso completo, incluida la medición del propio perfil de expresión, puede tener lugar en un sistema automático. Este sistema automático comprende los elementos siguientes:

a) medios para la medición de la expresión de una serie de genes importantes para la determinación de, por ejemplo, la dureza de la fruta, o los correspondientes genes, en una o más variedades de frutas, tales como  $\beta$ -xilosidasa ( $\beta$ xyI), poligalacturonidasa I y II (PGI y PGII), peroxidasa supuesta de la pared celular 424/87 (87), endotransglucosilasa de xiloglucano (XET), expansina y glucanasas tales como endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, D-sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP y/o alfa amilasa.

b) medios para la medición de la expresión de los genes control, tales como, por ejemplo, enzimas domésticas, tales como fosfoglicerato quinasa (PGK) o el factor de elongación 1 alfa (eF1 $\alpha$ ) u otros genes adecuados, tal como se describe en, por ejemplo, Nicot y col., J. Exp. Botany, 56:2907-2914, 2005. Todos estos genes deben (pueden) tenerse en cuenta en la determinación del patrón de expresión. Si uno de estos genes tiene el mismo nivel de expresión en todas las muestras analizadas, dicho gen es adecuado como gen constitutivo.

c) medios para determinar el perfil de expresión (relativo) de los genes mencionados en (a);

d) una o más líneas de calibración que representan la correlación de los perfiles de expresión de uno o más de los genes mencionados en a) y la dureza/maduración de una o más variedades de frutas; y

e) medios para interpretar los perfiles de expresión medidos de las una o más variedades de frutas en relación con la(s) líneas de calibración asociadas y, en base a estos, dar una indicación sobre la maduración de las una o más variedades de frutas, indicación que también implica una indicación del tiempo necesario hasta la maduración completa y/o hasta el momento óptimo de recolección.

En dicho sistema automático, pueden estar disponibles varias líneas de calibración de modo que el sistema se puede usar para varias variedades de frutas sin que sea necesario "cargar" cada vez la línea de calibración adecuada. Una posibilidad adicional es que el usuario proporcione al sistema datos específicos de las circunstancias después de la recolección de la fruta en cuestión, tal como, por ejemplo, el tiempo que la fruta se almacena

localmente, la duración del transporte etc., de modo que el sistema puede ser también flexible en lo que respecta a dichos datos.

En base al procedimiento descrito, también se puede desarrollar un kit para predecir o determinar el valor de una característica de calidad específica para un producto agrícola u hortícola específico. Con este fin se debe disponer de los marcadores siguientes: como mínimo dos marcadores, siendo preferentemente uno de los dos un marcador constitutivo (con el que se pueda obtener la expresión absoluta). La relación entre el o los marcadores y la característica se establece en un modelo (línea de calibración). Este modelo describe los diferentes niveles de expresión de los marcadores en el tiempo. El modelo se puede usar en, entre otros, un programa de ordenador para correlacionar los niveles de expresión determinados con la característica/calidad de la muestra. La cuantificación de los niveles de ARN, (expresión génica) puede tener lugar con, por ejemplo, PCR cuantitativa (Applied Biosystems, US). La cuantificación de las proteínas puede tener lugar usando anticuerpos en, por ejemplo, un inmunoensayo de flujo lateral. A continuación, los datos medidos se pueden introducir (de forma automática o de otro modo) en el modelo de ordenador, tras lo cual se genera el resultado de la prueba. Este resultado se puede mostrar después electrónicamente o de otra forma.

La invención también comprende una serie de marcadores como los que se han hallado en los experimentos descritos más adelante en el presente documento. Esto implica especialmente al marcador M8, que es importante para determinar la dureza de la fruta, el marcador GAST (tránsito estimulado por ácido giberélico), que es importante para determinar el momento óptimo de la recogida de los bulbos; y el marcador lipasa con motivo GDLSL, importante para determinar la duración de las flores cortadas en el florero. Como se muestra en los ejemplos, es posible usar solo una parte de la información genética de estos marcadores para demostrar la presencia. El hecho es que es suficiente si se pueden componer cebadores suficientes contra estas secuencias diana de los marcadores, de modo que el marcador se pueda amplificar y demostrar. En consecuencia, la invención comprende las secuencias de marcadores M8, GAST y lipasa con motivo GDLSL con una secuencia de nucleótidos como se indica en los Ejemplos y en el listado de secuencias (M8: SEC ID N° 13 y 14; GAST: SEC ID N° 21 y 22, lipasa con motivo GDLSL; SEC ID N° 27 y 28; en las que, en cada caso, la primera representa la secuencia de nucleótidos y la segunda la secuencia de aminoácidos. Tanto la secuencia de nucleótidos como la secuencia proteica pueden servir como marcadores, como se ha descrito anteriormente. Dado el hecho de que se pueden producir diferencias pequeñas en las secuencias en diferentes especies o variedades, la invención también se refiere a secuencias que son idénticas a las secuencias de las SEC ID N° 14, 22 y 28, respectivamente, en más de 70%, preferentemente más del 80%, más preferentemente más del 90%, más preferentemente más del 95% y más preferentemente más del 98%. La expresión "secuencia idéntica" como se usa en el presente documento normalmente se expresa como un porcentaje y se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos o de nucleótidos idénticos entre dos secuencias ya están dispuestos óptimamente uno al lado de otro. Para los fines de la presente invención, se mantiene que la identidad de las secuencias como porcentaje de residuos o nucleótidos idénticos se ha determinado con el bien conocido procedimiento BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que está disponible para el público a través del National Cancer Institute/National Institutes of Health (Bethesda, Maryland) y que se describe en numerosas publicaciones (véase, por ejemplo, Altschul et al., J. Mol. Biol., 215(3), 403-10 (1990)). Parámetros preferidos para una comparación BLAST de secuencias de aminoácidos con BLASTP son hueco abierto 11,0, extensión de hueco 1, matriz Blosom 62.

También es parte de la invención el uso de los marcadores M8, GAST y lipasa con motivo GDLSL para la determinación de los parámetros de calidad en plantas. Más específicamente, el uso de M8 reside en la determinación de la maduración de la fruta, en particular manzanas y/o peras, el uso de GAST en la determinación del momento óptimo de recogida de los bulbos, en particular tulipanes, y el uso de lipasa con motivo GDLSL en la determinación de la duración de las flores cortadas, en particular rosas, en el florero. En estos usos se puede usar los fragmentos como se muestran en el listado de secuencias o incluso, a su vez, fragmentos de los mismos, pero también se pueden usar los genes y/o proteínas completos como se encuentran en la naturaleza en las respectivas especies. En base a la información sobre la secuencia proporcionada en el presente documento, un experto puede encontrarlas fácilmente en el banco de datos o aislarlas fácilmente de un organismo. El término "anticuerpo" también se refiere a las formas de anticuerpos de unión a antígeno (p. ej., Fab, F(ab)<sub>2</sub>). El término "anticuerpo" generalmente se refiere a un polipéptido codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulinas, o fragmentos de los mismos que reconocen específicamente un antígeno y se unen a él. Aunque los diferentes fragmentos de anticuerpos se pueden definir en términos de las partes de un anticuerpo intacto, el experto se dará cuenta que dichos fragmentos también se pueden sintetizar *de novo*, químicamente o mediante metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también comprende fragmentos de anticuerpos, tales como Fv de una cadena, también anticuerpos quiméricos (es decir, anticuerpos que comprenden regiones constantes y variables de diferentes especies), anticuerpos humanizados (es decir, anticuerpos que comprenden una CDR (región determinante de la complementariedad) que no es de origen humano) y anticuerpos heteroconjugados (p. ej., anticuerpos biespecíficos).

### Ejemplos

Ejemplos domésticos que se pueden usar como genes constitutivos/control interno se describen en, entre otros, Nicot y col.. Journal of Experimental Botany, Vol 56:2907-2914, 2005.

**Ejemplo 1**

Determinación de la correlación de la expresión génica y la maduración de la fruta en numerosas variedades de manzana y pera.

5 Los datos se recogieron en varios huertos para dos variedades cultivadas de peras, Bon Chretien y Forelle, y dos variedades cultivadas de manzana Golden Delicious y Granny Smith. Estas 4 variedades cultivadas se recolectaron en Sudáfrica para la situación de Sudáfrica (recolección, breve almacenamiento, transporte condicionado a los mercados, tales como Europa). Justo después de la recolección (en un plazo de 48 horas) se determinó el valor de los diversos marcadores en la pulpa. Con este fin, el ARNm se aisló de una muestra mixta de frutas usando un protocolo CTAB (Plant Molecular Biology Reporter Vol. 11(2), 1993, pág. 113-116). Los diversos marcadores se identificaron mediante las técnicas mencionadas anteriormente de perfil de la expresión y se validaron mediante RT-PCR. Se realizó el uso de los siguientes conjuntos de cebadores para probar todas las muestras,

|             | Cebador directo         | Cebador inverso             |
|-------------|-------------------------|-----------------------------|
| PG          | GCCCTAATACGGACGGAATTC   | AATACAGTCATCACCTGTTCTATAACC |
| $\beta$ XYL | AACTAATTGGTGCTGCTGAGGTT | GTCCGGTCTCTGAACTCTGCTT      |
| 424/87      | TGGCTCAGGAACATCTTTCATG  | CTTGTTGAGTCCAGCAGCAGAG      |
| M8          | GGTGGCGGCATGGAGTT       | CCCTTTCCCGTAGGCTTCC         |
| EF1a        | TGGGTTTGAGGGTGACAACA    | TGATCAGGTCAAGAGCCTCAAG      |
| PGK         | CCTGAATTCGCCAAGAAGCT    | TGCATGAGCCCTATGAGCAGTA      |

15 En las mismas muestras se determinó la firmeza de la fruta usando un procedimiento estándar y un penetrómetro automático. Además, también se determinaron otros parámetros fisiológicos, tales como: color, contenido en almidón, contenido en azúcar y concentración de ácido málico.

Se siguió a este material durante el almacenamiento en Sudáfrica (para las manzanas, unas pocas semanas, y para las peras aproximadamente 10 días). Tras este almacenamiento, de nuevo se determinó el valor de los marcadores y se llevó a cabo una simulación del transporte (transporte en contenedor a, por ejemplo, Europa). A continuación, de nuevo se realizaron ensayos fisiológicos.

20 Se recolectaron manzanas Granny Smith durante la maduración y no maduraron mucho (permanecieron razonablemente duras). También se recogieron Forelle de forma prematura, pero estas maduraron considerablemente. Si las peras no se recogen pronto, se caen del árbol porque son demasiado pesadas. Se recogieron peras Golden Delicious y Bon Chretien más tarde durante el recorrido de maduración, por lo que maduraron más en el árbol.

25 Para las peras, especialmente los marcadores de textura betaxilosidasa ( $\beta$ xyl), poligalacturonasa I (PG1), y posible peroxidasa de la pared celular 424/87 (87) son relevantes. El inicio de la maduración y la evolución de la maduración se pueden establecer determinando cuando la actividad génica de estos marcadores comienza (véase la Fig. 1).

30 La Figura 1 muestra que la maduración en los diferentes huertos comienza en momentos diferentes. Especialmente, los huertos Bo Radyn van por delante de los demás. La maduración tardía también puede deberse al uso de inhibidores concretos, tales como, por ejemplo, Retain (un inhibidor de etileno). Para el gráfico de la Fig. 1 se han combinado las actividades de los tres marcadores, pero esto no es estrictamente necesario. En principio, cada uno de los marcadores mencionados anteriormente es una buena medida. Los valores de los marcadores se han corregido cada vez comparándolos con la actividad de un marcador constitutivo (fosfogluconato quinasa (PGK) o factor de elongación 1 alfa (eF1a).

35 La dureza prevista tras la llegada al área de comercialización (p. ej., Europa) se puede predecir en el momento de la recolección, pero también antes del primer almacenamiento, dependiendo del tratamiento posterior a la recolección, determinando los valores de los marcadores de textura durante la recolección o después del almacenamiento y comparándolos con una línea de calibración. La línea de calibración difiere de forma natural en función del tratamiento (p. ej., temperatura de refrigeración, tratamiento con inhibidores de etileno y similares). Parece que existe un orden en la eficacia del marcador de texturas según el momento en el recorrido de maduración. Al principio en el recorrido de maduración,  $\beta$ xyl es importante, después PG1 y después 424/87.

45 La Figura 2 muestra claramente que la dureza en el área de comercialización tiene una relación clara con el valor de estos marcadores de textura en el momento de la medición. Al principio durante la maduración (recolección), M1 (PG1) da los mejores valores y, más tarde, en 424/87 (tras un breve almacenamiento). Para Forelle, que se recolecta al principio, primero  $\beta$ xyl da la mejor correlación y después PG1.

Para manzanas, en principio se aplica lo mismo. En el presente documento también, la etapa de maduración se puede determinar mediante una combinación de marcadores de textura. En este caso, lo que está implicado es la combinación de  $\beta$ xyl y PG1, ya que en las Granny Smith la maduración procede lentamente (véase la Fig. 4). La dureza prevista en el área de comercialización puede predecirse especialmente mediante el valor de la actividad génica del marcador  $\beta$ xyl durante la recolección y tras un breve almacenamiento. Esto es porque la maduración (y especialmente el ablandamiento) en las Granny Smith únicamente procede muy despacio (véase la Fig. 5). En las manzanas cv. Golden Delicious, la situación es, de nuevo, similar (véase la Fig. 6). Los marcadores PG1 and  $\beta$ xyl son, de nuevo, de importancia en conjunto, ya que la maduración procede muy rápido y la recolección también tiene lugar más tarde en el proceso de maduración, en esta cv se añade otro marcador. Este marcador M8 tiene la siguiente secuencia (SEC ID N° 13).

```

gtacatgttcaccactactgctgaacgggaattgtccgtgatatgaaggagaagcttgcataatgttgcctggactatgagcaa
gaacttgagactgccaagagcagctcttcagttgagaagaactatgagcttcccgatggccaagtcacacaattggagctgag
agattccgggtcccagaagtcctctttcaaccatctcttatiggaatggaagctgctggcatcatgagactactacaactctatc
atgaagtgtgatgtggatatacagaaaagacctatggaacatcgtgctcagtggtgggtcaactatgttcctggtattgcag
accgtatgagccgggagatcaactgctcttctccaangcagcatgaagatcaaggtttagctccaccagagagaaagtaacgag
gggacgatagccaatcagaaaaaagaaaggcacaagtcggcaaaaatgtctgctcagttatggcttgttccgtgagccta
aaacctctcccttcactgttcagaagtcagcagigagaggccttccctctcttccaggtctctgcttcattcaaggtgcaagcc
agtggcgtcaagaaaatcaagactgccacccataggaactggtggcgcatggagttgaggaacgggtgtgatgcctctggg
aggaagcctacgggaaaggtgtctaccagttttagacaagtae.
    
```

El marcador M8 tiene la puntuación de homología más alta con una actina de la pera. La entrada en el NCBI para este es <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=60650116>. La Figura 7 da una correlación de la actividad de este gen en relación con la dureza tras el primer almacenamiento.

### Ejemplo 2

Determinación del tiempo óptimo de recogida de tulipanes mediante la correlación con la calidad de la floración después de la recolección con expresión génica alrededor del tiempo de recolección.

Durante un periodo de cuatro años se obtuvieron muestras cada vez de tres cultivos de tulipán, cv 'Apeldoorn', cv 'Leen van de Mark' y cv 'Prominence', en los mismos lotes de crecimiento. La obtención de muestras se llevó a cabo a diferentes tiempos en la temporada, de 6 a 7 semanas antes de la fecha prevista de recogida con un intervalo de 2 semanas, al menos 1 semana antes de la fecha prevista de recogida, en el momento de la recogida y una semana después. Cada vez se obtuvieron muestras de los lotes en crecimiento por la mañana, tras lo cual tuvo lugar el procesamiento de la muestra durante el resto del día. A partir de la escala del bulbo más externo, se tomó una porción de tejido de 1 cm<sup>2</sup> de tamaño, que se fijó en nitrógeno líquido de inmediato. Después, en este tejido, se determinó la expresión génica de un número considerable de genes en base al cual se identificaron 3 marcadores que tienen una relación con el tiempo de la recolección durante todas las temporadas medidas y en cada variedad cultivada.

Para poder establecer el tiempo óptimo de recogida en relación con la calidad del producto en el recorrido posterior a la recolección, se reservó una porción de los bulbos de la muestra de cambio para almacenamiento. Tras el almacenamiento, estos bulbos se forzaron después y se plantaron con vistas a evaluar la calidad de la flor y el tallo resultantes y a correlacionar el valor de los marcadores con los valores obtenidos de los parámetros de calidad de la floración. Los parámetros de calidad objetivos en la evaluación fueron el peso de la flor y la longitud de tallo.

Después se llevó a cabo la validación de estos marcadores durante dos temporadas adicionales, cuando también se tomaron muestras de otras localizaciones en crecimiento. Con este fin, cada vez se tomó una muestra mixta de 10 bulbos para aislar el ARN en el que se estableció la concentración de los marcadores usando PCR cuantitativa.

En el procedimiento de PCR se usaron las siguientes combinaciones de cebadores, correspondientes a las secuencias de nucleótidos de los tres marcadores aislados de la cv 'Prominence':

|       | <b>Marcador Cebador directo</b>  | <b>Cebador inverso</b>                 |
|-------|----------------------------------|--|
| GAST  | 5'-GGCACCTACGGCAACTATGATAG-3'    | 5'-CACTTGCAGACCATGATG-3'               |
| EIF4a | 5'-CGTCCCGTGTCACAAAGTTG-3'       | 5'-CCATCGTATCGGTCGTAGTGG-3'            |
| EFIA  | 5'-TTGATATTGCTCTCTGGMGTTTGGAG-3' | 5'-AGTTCAGTAATCATCATGTTCTTAATGAAGTC-3' |

La evolución de los valores de medición combinados de los marcadores para las variedades cultivadas de 'Prominence' y 'Apeldoorn' se representa en la Fig. 11. Desde tres semanas antes del momento óptimo de recolección hasta el momento óptimo de recolección que se determinó en las pruebas de floración, la evolución de los marcadores, representada logarítmicamente frente al tiempo, exhibe un patrón casi lineal y reproducible. El valor del marcador se correlacionó con el valor para el parámetro de la calidad de la floración para determinar a qué valor del marcador se alcanzó el tiempo óptimo de recogida. Para una variedad cultivada concreta, la evolución lineal de los marcadores es idéntica; entre las variedades cultivadas existe una diferencia en la evolución lineal. Combinando los valores de medición de diferentes años se puede determinar una línea de calibración fiable por variedad cultivada. En base a esta línea de calibración es posible predecir el tiempo óptimo de recogida en una nueva temporada en base a únicamente 1 o 2 mediciones de las muestras que se tomaron en el campo entre 2 semanas y el tiempo previsto de recogida.

El marcador GAST tiene la siguiente secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 21):

```
gatcatccagttactaagctaagcaagccctcctcctcaacttatacaatgacttcatccacctccatcc
tgacatcccttgtgcttctctcctccttgcgggtctcgtcgagccccgcctggagattgaaccggaaa
cgggatagaaggctctctctaggtgggctaagtaagcaactctccgaactatcactaatcagtatgtt
ggatctctagagagaagttaacctagattgttatgatgatcaggtgcggtgcggcgtgcttggtag
gtgcagcagtcatacaaggccgaatctgtgcaagggcgtgcgggacatgctgtgcaagggtgcagctgc
gtcccaccgggacctaaggcaactatgatagctgcccttgttaagcttcaactcaccacccatcatggtg
ctcgaagtgcccttaaacatgaagaataaattggtgtgtcataggtgatgaaagtggttcgcttgttc
gatataataatgtaataaaacgttcaaaacaaactcagttattcgaataaagagg
```

- 15 La expresión del marcador GAST se hace mensurable adecuadamente desde 3 semanas antes del momento de la recolección. Antes de este punto de tiempo no se puede obtener un valor fiable para este marcador. A partir de tres semanas antes de la recolección, la expresión aumenta de forma exponencial y en el momento de recolección óptimo alcanza un valor que es el mismo en las tres variedades cultivadas medidas. Después del momento de recolección óptimo, este marcador obtiene un valor constante.
- 20 Los otros marcadores EIF4a y EFIA, son genes constitutivos cuya expresión no varía en ninguno de los momentos medidos antes, durante y después de la recolección de los bulbos de tulipanes. Los valores medios de estos marcadores se usan para la normalización con el fin de permitir la comparación de las series medidas.

### Ejemplo 3

#### Determinación de la correlación de la expresión génica y la calidad de las rosas cortadas

25 Los datos de expresión génica se usaron para predecir la duración de las rosas en el florero. En la práctica, parece que algunas rosas se mantienen bien en el florero con el consumidor durante solo 5 días, mientras que otras rosas (de la misma variedad cultivada) en ocasiones se mantienen bien durante hasta 10 días. Esto a menudo se debe a su recolección mientras estaban demasiado poco maduras, lo que compromete la calidad.

30 Se investigó de cual gen o genes la expresión exhibe una buena correlación con el tiempo de recolección y la calidad. Con los datos de expresión génica, usando las técnicas mencionadas anteriormente, se llevó a cabo una correlación con la duración en el florero de la rosa. Determinando la expresión relativa en los pétalos de la flor durante y después de la recolección permitió realizar una predicción aproximada de la duración prevista de la rosa en el florero. El gen que se encontró que era útil para este fin es de una lipasa de motivo GDSL en combinación con un marcador constitutivo, en este caso el factor de elongación 1 $\alpha$ , véase la Fig. 12. También cuando las rosas se almacenan a 4 °C, la diferencia en la duración en el florero permanece mensurable. Los valores hallados son consistentes entre diferentes variedades cultivadas y entre diferentes años de recolección. Este marcador se validó con RT-PCR. Se realizó el uso de los siguientes conjuntos de cebadores para probar todas las muestras,

|                        | <b>Cebador directo</b>  | <b>Cebador inverso</b>      |
|------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Lipasa con motivo GDSL | AGGATTTGAGAACACCAATTTGC | GAGTTCAATGACAAGCTGAATAAGTTG |
| EF1                    | TGGTGTCAAGCAGATGATTTGC  | TTCATCGTACCTTGCCTTTGAG      |

40 La lipasa con motivo GDSL tiene la secuencia siguiente (la hebra complementaria inversa codificante se representa en la SEC ID N° 27):

gtactacaataactactaaataccgtattatcatattgccactccatgggtggaagtagaaacatc  
 cactgtagaaagcaaaatgaagacttacctccagaatgcaattctaacaacctaataagtaataactat  
 acttagttgggcacaaacaaatagtagctggggataaaagccatataatcaacctatctaaagtgatagg  
 aacctagattataataattttatgccctagctttcatatataattgaaggaaaattaaaggaaactggg  
 tcaggacacgtttgactatgtaatcagagatgatctggtttgctttctctgtgggatggaaggagtccca

gaagatgtatttgcttgcatcagtgcatgtgaacatggtggttcggttgcatgcatatcccattctcaaac  
 attcctgtggcacaacaagccactgatgtcacctcaaaaccgtaaaaagaaggccttcttatcatataca  
 ggaaaacaaaataaggattgagaacaccaatttgcttccaggaagctcttatgaggctgacgggtcaa  
 ctattcagcttgcatgaaactcaaaagccacatcgttgtaattcgaaatgcagtcatttccatccatg  
 atattactggttctctaatggcaagcatcccattggaggcagtcctcccacggaaatttccgagctc  
 cgagcttgtagagtccctcacgaaattcgctgcatccgatgagaaagtcttggtattgggaggtgatg  
 gtattggggatgatcggcctgatggtggaatgtgg

5 El marcador tiene la puntuación de homología más alta con una posible lipasa con motivo GDSL/hidrolasa de *Arabidopsis* (At2g04570). En *Arabidopsis*, este gen se expresa específicamente en yemas y estomas.

**Ejemplo 4**

Determinación de la correlación de la expresión génica y la maduración de la fruta en numerosas variedades de manzana y pera.

10 Se recogieron datos de varios huertos para la variedad cultivada de peras Conferencia y la variedad cultivada de manzanas Kanzi. Estas 2 variedades cultivadas se recolectaron en los Países Bajos de la zona holandesa (recolección, almacenamiento acondicionado (4-10 meses)). Justo después de la recolección (en un plazo de 48 horas) se determinó el valor de los diversos marcadores en la pulpa. Con este fin, el ARNm se aisló de una muestra mixta de frutas usando un protocolo CTAB (Plant Molecular Biology Reporter Vol. 11(2), 1993, pág. 113-116). Los diversos marcadores se identificaron mediante las técnicas mencionadas anteriormente de perfil de la expresión y se validaron mediante RT-PCR. Se realizó el uso de los siguientes conjuntos de cebadores para probar todas las muestras,

|      | <b>Cebador directo</b>  | <b>Cebador inverso</b>      |
|------|-------------------------|-----------------------------|
| PG   | GCCCTAATACGGACGGAATTC   | AATACAGTCATCACCTGTTCTATAACC |
| βXYL | AACTAATTGGTGCTGCTGAGGTT | GTCCGGTCTCTGAACTCTGCTT      |
| EF1a | TGGGTTTGAGGGTGACAACA    | TGATCAGGTCAAGAGCCTCAAG      |
| PGK  | CCTGAATTCGCCAAGAAGCT    | TGCATGAGCCCTATGAGCAGTA      |

20 En las mismas muestras se determinó la firmeza de la fruta usando un procedimiento estándar y un penetrómetro automático. Además, también se determinaron otros parámetros fisiológicos, tales como: color, contenido en almidón, contenido en azúcar y concentración de ácido málico.

Se siguió a este material durante el almacenamiento en los Países Bajos en almacenes en frío con baja concentración de oxígeno, se tomaron muestras después de aproximadamente 5 meses de almacenamiento. Con estas muestras de nuevo se realizaron determinaciones fisiológicas.

25 Para manzanas y peras, especialmente los marcadores de textura beta-xilosidasa (βxyl) y poligalacturonasa I (PG1) demostraron ser relevantes en la situación holandesa. El inicio de la maduración y la evolución de la maduración se pueden establecer determinando cuando la actividad génica de estos marcadores comienza (véase la Fig. 8). En la Fig. 8, la expresión de βxyl se representa frente al tiempo en días. Como origen se tomó el momento de recolección óptimo (establecido con parámetros fisiológicos) porque esto permite establecer comparaciones entre diferentes años. En la Fig. 8 se puede ver claramente que la evolución de este marcador es casi idéntica entre diferentes años y puede usarse bien para establecer el momento de recolección óptimo. En la Fig. 8 se usó un marcador, pero el patrón de expresión de PG procede del mismo modo y se puede usar opcionalmente junto con βxyl para obtener una resolución todavía mejor. Los valores de los marcadores se corrigieron cada vez comparándolos con la actividad de un marcador constitutivo (fosfoglucomerato quinasa (PGK) o factor de elongación 1 alfa (eF1a).

35 La dureza prevista tras después de salir del almacenamiento en frío tras meses de almacenamiento se puede predecir en el momento de la recolección, dependiendo del tratamiento posterior a la recolección, determinando los valores de los marcadores de textura después del almacenamiento y comparándolos con una línea de calibración. La línea de calibración difiere de forma natural en función del tratamiento (p. ej., temperatura de refrigeración,

tratamiento con inhibidores de etileno y similares).

Las Fig. 9 y 10 muestran claramente que la dureza después del almacenamiento de manzanas y peras tiene una relación clara con el valor de estos marcadores de textura en el momento de la recolección. De nuevo, esto se mantiene tanto para PG como para  $\beta$ xyl.

5 **Listado de secuencias**

<110> Expressive research B.V. de Boer, Anne D Ebskamp, Michaël J.M. Gierkink, Joost J.T. Laros, Ivo

<120> Determinación de las características de calidad en cultivos agrícolas y de horticultura

10 <130> P79586PC00

<150> NL 1033431

<151> 2007-02-20

15 <160> 28

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Cebador directo de PG

<400> 1

gccctaatac ggacggaatt c 21

30 <210> 2

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> Cebador inverso de PG

<400> 2

aatacagtca tcacctgttc ctataacc 28

<210> 3

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador directo de beta-xil

10

<400> 3

aactaattgg tgctgctgag gtt 23

<210> 4

15 <211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Cebador inverso de beta-xil

<400> 4

gtccggcttc tgaactctgc tt 22

25 <210> 5

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> cebador directo de 42/87

<400> 5

tggtcagga acatcttca tg 22

35

<210> 6

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Cebador inverso de 424/87

<400> 6

cttggtgagt ccagcagcag ag 22

10 <210> 7

<211> 17

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> cebador directo de M8

<400> 7

ggtggcggca tggagtt 17

20

<210> 8

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> cebador inverso de M8

<400> 8

30 cccttccc taggctcc 19

<210> 9

<211> 20

<212>ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> cebador directo de EF1a

<400> 9

tgggttgag ggtgacaaca 20

5

<210> 10

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> cebador inverso de EF1a

<400> 10

15 tgatcaggtc aagagcctca ag 22

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> cebador directo de PGK

25 <400> 11

cctgaattcg ccaagaagct 20

<210> 12

<211> 22

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso de PGK

35

<400> 12

tgcatgagcc ctatgagcag ta 22

ES 2 420 836 T3

<210> 13

<211> 723

<212> ADNA

5 <213> Malus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(502)

10

<400> 13

```

g tac atg ttc acc act act gct gaa cgg gaa att gtc cgt gat atg aag      49
Tyr Met Phe Thr Thr Thr Ala Glu Arg Glu Ile Val Arg Asp Met Lys
1           5           10           15

gag aag ctt gca tat gtt gct ctg gac tat gag caa gaa ctt gag act      97
Glu Lys Leu Ala Tyr Val Ala Leu Asp Tyr Glu Gln Glu Leu Glu Thr
           20           25           30

gcc aag agc agc tct tca gtt gag aag aac tat gag ctt ccc gat ggc      145
Ala Lys Ser Ser Ser Ser Val Glu Lys Asn Tyr Glu Leu Pro Asp Gly
           35           40           45

caa gtc atc aca att gga gct gag aga ttc cgg tgc cca gaa gtc ctc      193
Gln Val Ile Thr Ile Gly Ala Glu Arg Phe Arg Cys Pro Glu Val Leu

```

ES 2 420 836 T3

|  |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|
| 50   | 55  | 60  |     |
| ttt caa cca tct ctt att gga atg gaa gct gct ggc att cat gag act    |     |     | 241 |
| Phe Gln Pro Ser Leu Ile Gly Met Glu Ala Ala Gly Ile His Glu Thr    |     |     |     |
| 65   | 70  | 75  | 80  |
| act tac aac tct atc atg aag tgt gat gtg gat atc aga aaa gac cta    |     |     | 289 |
| Thr Tyr Asn Ser Ile Met Lys Cys Asp Val Asp Ile Arg Lys Asp Leu    |     |     |     |
|  | 85  | 90  | 95  |
| tat gga aac atc gtg ctc agt ggt ggg tca act atg ttc cct ggt att    |     |     | 337 |
| Tyr Gly Asn Ile Val Leu Ser Gly Gly Ser Thr Met Phe Pro Gly Ile    |     |     |     |
|  | 100 | 105 | 110 |
| gca gac cgt atg agc cgg gag atc act gct ctt gct cca agc agc atg    |     |     | 385 |
| Ala Asp Arg Met Ser Arg Glu Ile Thr Ala Leu Ala Pro Ser Ser Met    |     |     |     |
|  | 115 | 120 | 125 |
| aag atc aag gtt gta gct cca cca gag aga aag tac gcg ggg acg ata    |     |     | 433 |
| Lys Ile Lys Val Val Ala Pro Pro Glu Arg Lys Tyr Ala Gly Thr Ile    |     |     |     |
|  | 130 | 135 | 140 |
| gcc aat cag aaa aag aaa aag gca caa gtc cgg caa aaa tgt ctg cct    |     |     | 481 |
| Ala Asn Gln Lys Lys Lys Lys Ala Gln Val Arg Gln Lys Cys Leu Pro    |     |     |     |
| 145  | 150 | 155 | 160 |
| cag tta tgg ctt gtt ccg tga gcctaaaacc atctcccttc actgttcaga       |     |     | 532 |
| Gln Leu Trp Leu Val Pro  |     |     |     |
|  | 165 |     |     |
| agtcagcagt gagaggcctt ccctctcttt ccaggctcttc tgettcatte aagggtcaag |     |     | 592 |
| ccagtggcgt caagaaaatc aagactgccca ccccatatgg aactggtggc ggcatggagt |     |     | 652 |
| tgaggaacgg tgttgatgcc tctgggagga agcctacggg aaagggtgtc taccagtttg  |     |     | 712 |
| tagacaagta c   |     |     | 723 |

<210> 14

<211> 166

5 <212> PRT

<213> Malus sp.

<400> 14

|   |  |  |    |   |  |  |  |    |  |  |  |  |  |    |  |  |  |
|---|--|--|----|---|--|--|--|----|--|--|--|--|--|----|--|--|--|
| Tyr Met Phe Thr Thr Thr Ala Glu Arg Glu Ile Val Arg Asp Met Lys |  |  |    |   |  |  |  |    |  |  |  |  |  |    |  |  |  |
| 1   |  |  |    | 5 |  |  |  | 10 |  |  |  |  |  | 15 |  |  |  |
| Glu Lys Leu Ala Tyr Val Ala Leu Asp Tyr Glu Gln Glu Leu Glu Thr |  |  |    |   |  |  |  |    |  |  |  |  |  |    |  |  |  |
|   |  |  | 20 |   |  |  |  | 25 |  |  |  |  |  | 30 |  |  |  |
| Ala Lys Ser Ser Ser Ser Val Glu Lys Asn Tyr Glu Leu Pro Asp Gly |  |  |    |   |  |  |  |    |  |  |  |  |  |    |  |  |  |
|   |  |  | 35 |   |  |  |  | 40 |  |  |  |  |  | 45 |  |  |  |
| Gln Val Ile Thr Ile Gly Ala Glu Arg Phe Arg Cys Pro Glu Val Leu |  |  |    |   |  |  |  |    |  |  |  |  |  |    |  |  |  |
|   |  |  | 50 |   |  |  |  | 55 |  |  |  |  |  | 60 |  |  |  |
| Phe Gln Pro Ser Leu Ile Gly Met Glu Ala Ala Gly Ile His Glu Thr |  |  |    |   |  |  |  |    |  |  |  |  |  |    |  |  |  |



<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> cebador directo de EIF4a

<400> 17

10 cgtcccgtgt cacaagttg 20

<210> 18

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso de EIF4a

20 <400> 18

ccatcgtatc ggtcgtagt g 21

<210> 19

<211> 26

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador directo de EFIA

30

<400> 19

ttgatattgc tctctggaag tttgag 26

<210> 20

35 <211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 420 836 T3

<220>

<223> cebador inverso de EFIA

5 <400> 20

agttccagta atcatgttct taatgaagtc 30

<210> 21

<211> 546

10 <212>ADN

<213> Tulipa sp.

<220>

<221> CDS

15 <222> ((49)..(168))

<220>

<221> CDS

<222> (258)..(434)

20

<400> 21

|   |     |
|---|-----|
| gatcatccag ttactaagct aagcaagccc tccttctctca acctatca atg act tca | 57  |
| Met Thr Ser   |     |
| 1   |     |
| tcc acc tcc atc ctg aca tcc ctt gtg ctt ctc ttc ctc ctt gtc ggt   | 105 |
| Ser Thr Ser Ile Leu Thr Ser Leu Val Leu Leu Phe Leu Leu Val Gly   |     |
| 5 10 15   |     |
| ctc gtc gag ccc cgc ctg gag att gaa ccc gga aac ggg ata gaa agg   | 153 |
| Leu Val Glu Pro Arg Leu Glu Ile Glu Pro Gly Asn Gly Ile Glu Arg   |     |
| 20 25 30 35   |     |

ES 2 420 836 T3

tct ctt cta ggt ggg ctaagtaagc aactcttccg aactatcact aatcagtatg 208  
 Ser Leu Leu Gly Gly  
 40

ttggtattct tagagagaag ttaaccatag attgttatga tgatcaggc tgc ggt gcg 266  
 Cys Gly Ala

gcg tgc ttg gtg agg tgc agc gag tca tca agg ccg aat ctg tgc aag 314  
 Ala Cys Leu Val Arg Cys Ser Glu Ser Ser Arg Pro Asn Leu Cys Lys  
 45 50 55

agg gcg tgc ggg aca tgc tgt gca agg tgc agc tgc gtc cca ccg ggc 362  
 Arg Ala Cys Gly Thr Cys Cys Ala Arg Cys Ser Cys Val Pro Pro Gly  
 60 65 70 75

acc tac ggc aac tat gat agc tgc cct tgt tac gct tca ctc acc acc 410  
 Thr Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Cys Pro Cys Tyr Ala Ser Leu Thr Thr  
 80 85 90

cat cat ggt gct cgc aag tgc cct taaacatgaa gaataaattg gtgtgtcata 464  
 His His Gly Ala Arg Lys Cys Pro  
 95

ggtgatgaaa gtgggttcgc ttgttcgata tatatatatg taataaaacg ttcaaacaaa 524

ctcagttatt cgaataaaga gg 546

<210> 22

5 <211> 99

<212> PRT

<213> Tulipa sp.

<400> 22

10

Met Thr Ser Ser Thr Ser Ile Leu Thr Ser Leu Val Leu Leu Phe Leu  
 1 5 10 15

Leu Val Gly Leu Val Glu Pro Arg Leu Glu Ile Glu Pro Gly Asn Gly  
 20 25 30

Ile Glu Arg Ser Leu Leu Gly Gly Cys Gly Ala Ala Cys Leu Val Arg  
 35 40 45

Cys Ser Glu Ser Ser Arg Pro Asn Leu Cys Lys Arg Ala Cys Gly Thr  
 50 55 60

Cys Cys Ala Arg Cys Ser Cys Val Pro Pro Gly Thr Tyr Gly Asn Tyr  
 65 70 75 80

Asp Ser Cys Pro Cys Tyr Ala Ser Leu Thr Thr His His Gly Ala Arg  
 85 90 95

Lys Cys Pro

<210> 23

<211> 23

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador directo de la lipasa con motivo GDSL

10 <400> 23

aggattgag aacaccaatt tgc 23

<210> 24

<211> 27

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso de la lipasa con motivo GDSL

20

<400> 24

gagttcaatg acaagctgaa taagtg 27

<210> 25

25 <211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> cebador directo de EF1a

<400> 25

tggtgtcaag cagatgattt gc 22

35 <210> 26

<211> 22

<212> ADN

ES 2 420 836 T3

<213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso de EF1a

5

<400> 26

ttcatcgtac cttgccttg ag 22

<210> 27

10

<211> 800

<212> ADN

<213> Rosa sp.

<220>

15

<221> CDS

<222> (1)..(540)

<400> 27

```
cca cat ttc cac cat cag gcc gat cat ccc caa tac act acc tcc caa 48
Pro His Phe His His Gln Ala Asp His Pro Gln Tyr Thr Thr Ser Gln
1          5          10          15
```

ES 2 420 836 T3

|   |     |
|---|-----|
| tac caa gac ttt ctc atc gga atc gca gcg aat ttc gtg aag gaa ctc<br>Tyr Gln Asp Phe Leu Ile Gly Ile Ala Ala Asn Phe Val Lys Glu Leu<br>20 25 30        | 96  |
| tac aag ctc gga gct cgg aaa att tcc gtg gga gga ctg cct cca atg<br>Tyr Lys Leu Gly Ala Arg Lys Ile Ser Val Gly Gly Leu Pro Pro Met<br>35 40 45        | 144 |
| gga tgc ttg cca tta gag aga acc agt aat atc atg gat gga aat gac<br>Gly Cys Leu Pro Leu Glu Arg Thr Ser Asn Ile Met Asp Gly Asn Asp<br>50 55 60        | 192 |
| tgc att tcg aat tac aac gat gtg gct ttg gag ttc aat gac aag ctg<br>Cys Ile Ser Asn Tyr Val Asn Asp Val Ala Leu Glu Phe Asn Asp Lys Leu<br>65 70 75 80 | 240 |
| aat aag ttg acc gtc agc ctc aat aaa gag ctt cct gga agc aaa ttg<br>Asn Lys Leu Thr Val Ser Leu Asn Lys Glu Leu Pro Gly Ser Lys Leu<br>85 90 95        | 288 |
| gtg ttc tca aat cct tat ttt gtt ttc ctg tat atg ata aga agg cct<br>Val Phe Ser Asn Pro Tyr Phe Val Phe Leu Tyr Met Ile Arg Arg Pro<br>100 105 110     | 336 |
| tct ttt tac ggt ttt gag gtg aca tca gtg gct tgt tgt gcc aca gga<br>Ser Phe Tyr Gly Phe Glu Val Thr Ser Val Ala Cys Cys Ala Thr Gly<br>115 120 125     | 384 |
| atg ttt gag atg gga tat gca tgc aac cga aac aac atg ttc aca tgc<br>Met Phe Glu Met Gly Tyr Ala Cys Asn Arg Asn Met Phe Thr Cys<br>130 135 140         | 432 |
| act gat gca agc aaa tac atc ttc tgg gac tcc ttc cat ccc aca gag<br>Thr Asp Ala Ser Lys Tyr Ile Phe Trp Asp Ser Phe His Pro Thr Glu<br>145 150 155 160 | 480 |
| aaa gca aac cag atc atc tct gat tac ata gtc aaa cgt gtc ctg acc<br>Lys Ala Asn Gln Ile Ile Ser Asp Tyr Ile Val Lys Arg Val Leu Thr<br>165 170 175     | 528 |
| cag ttt cct taa ttttccttca attaatatat gaaagctagg gcataaaatt<br>Gln Phe Pro  | 580 |
| attataaatc taggttccta tcactttaga taggttgata tatggcttta tccccagcta   | 640 |
| ctatatttgt ttgtgccaa ctaagtatag ttattactta ttaggttgt tagaattgca   | 700 |
| ttctggaggt aagtcttcat ttgtcttct acagtggatg tttctacttc caccatggag  | 760 |
| tggcaatatg ataatacggg atttagtagt attgtagtac   | 800 |

<210> 28  
5 <211> 179  
<212> PRT  
<213> Rosa sp.

<400> 28

10

Pro His Phe His His Gln Ala Asp His Pro Gln Tyr Thr Thr Ser Gln  
1 5 10 15

ES 2 420 836 T3

Tyr Gln Asp Phe Leu Ile Gly Ile Ala Ala Asn Phe Val Lys Glu Leu  
 20 25 30  
 Tyr Lys Leu Gly Ala Arg Lys Ile Ser Val Gly Gly Leu Pro Pro Met  
 35 40 45  
 Gly Cys Leu Pro Leu Glu Arg Thr Ser Asn Ile Met Asp Gly Asn Asp  
 50 55 60  
 Cys Ile Ser Asn Tyr Asn Asp Val Ala Leu Glu Phe Asn Asp Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Asn Lys Leu Thr Val Ser Leu Asn Lys Glu Leu Pro Gly Ser Lys Leu  
 85 90 95  
 Val Phe Ser Asn Pro Tyr Phe Val Phe Leu Tyr Met Ile Arg Arg Pro  
 100 105 110  
 Ser Phe Tyr Gly Phe Glu Val Thr Ser Val Ala Cys Cys Ala Thr Gly  
 115 120 125  
 Met Phe Glu Met Gly Tyr Ala Cys Asn Arg Asn Asn Met Phe Thr Cys  
 130 135 140  
 Thr Asp Ala Ser Lys Tyr Ile Phe Trp Asp Ser Phe His Pro Thr Glu  
 145 150 155 160  
 Lys Ala Asn Gln Ile Ile Ser Asp Tyr Ile Val Lys Arg Val Leu Thr  
 165 170 175  
 Gln Phe Pro

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de determinación de marcadores genéticos o proteicos/enzimáticos para predecir, en el momento de la recolección, el valor previsto de una característica de calidad relevante para un producto agrícola y/u hortícola en un momento dado durante o después de la recolección, que comprende las etapas de:
- 5
- a. definir un valor de medición cuantitativo o relativo para la característica de calidad relevante para el producto agrícola u hortícola específico.
- b. determinar los niveles de expresión de un conjunto de genes, preferentemente en relación con la característica de calidad específica o la concentración de proteínas de un conjunto de proteínas/enzimas, en relación preferentemente con la característica de calidad específica en varios puntos de tiempo antes, durante y después de la recolección.
- 10
- c. determinar la correlación de los niveles de expresión determinados en b) o de las concentraciones de proteínas determinadas en b) con el valor (de acuerdo con la definición determinada en a)) de la característica de calidad específica para dicho producto agrícola u hortícola en un momento dado durante o después de la recolección; y
- 15
- d. identificación de dichos genes de b) que muestran una elevación o disminución del perfil del nivel de expresión o las proteínas/enzimas de b) que muestran una elevación o disminución de la evolución de la concentración y que tienen un coeficiente de correlación con el valor del factor de calidad en un momento dado durante o después de la recolección en el intervalo de 0,3-1, preferentemente en el intervalo de 0,4-1, más preferentemente en el intervalo de 0,5-1, más preferentemente en el intervalo de 0,6-1, más preferentemente en el intervalo de 0,7-1, más preferentemente en el intervalo de 0,8-1, lo más preferentemente en el intervalo de 0,9-1.
- 20
- e. determinación de una línea de calibración que, para un recorrido posterior a la recolección específico, fija la relación entre la actividad génica del gen o el valor de la concentración de la proteína/enzima en el momento de la recolección con el coeficiente de correlación más elevado determinado en 1d y el valor de la característica de calidad específica en un momento dado durante o después de la recolección para el producto agrícola u hortícola específico;
- 25
- f. y, determinar opcionalmente líneas de calibración específicas basadas en el procedimiento anterior para diferentes tipos de recorridos posteriores a la recolección.
- 30
2. Un procedimiento de determinación de marcadores genéticos o proteicos/enzimáticos para, durante un recorrido posterior a la recolección específico, predecir el valor previsto de la característica de calidad relevante para dicho producto agrícola y/u hortícola, que comprende las etapas de:
- a. definir un valor de medición cuantitativo o relativo para la característica de calidad relevante para el producto agrícola u hortícola específico.
- 35
- b. determinar los niveles de expresión de un conjunto de genes, preferentemente en relación con la característica de calidad específica o la concentración de proteínas de un conjunto de proteínas/enzimas, en relación preferentemente con la característica de calidad específica en varios puntos de tiempo durante el recorrido posterior a la recolección.
- c. determinar la correlación de los niveles de expresión determinados en b) o de las concentraciones de proteínas determinadas en b) con el valor (de acuerdo con la definición determinada en a)) de la característica de calidad específica para dicho producto agrícola u hortícola en un momento dado después de la recolección; e
- 40
- d. identificación de dichos genes de b) que muestran una elevación o disminución del perfil del nivel de expresión o las proteínas/enzimas de b) que muestran una elevación o disminución de la evolución de la concentración y que tienen un coeficiente de correlación con el valor del factor de calidad en un momento dado después de la recolección en el intervalo de 0,3-1, preferentemente en el intervalo de 0,41, más preferentemente en el intervalo de 0,5-1, más preferentemente en el intervalo de 0,6-1, más preferentemente en el intervalo de 0,7-1, más preferentemente en el intervalo de 0,8-1, lo más preferentemente en el intervalo de 0,9-1.
- 45
- e. determinación de una línea de calibración que, para dicho recorrido posterior a la recolección específico, fija la relación entre la actividad génica del gen o el valor de la concentración de la proteína/enzima durante dicho recorrido posterior a la recolección con el coeficiente de correlación más elevado determinado primero y el valor de la característica de calidad específica en un momento dado después de la recolección para el producto agrícola u hortícola específico;
- 50
- f. y, determinar opcionalmente líneas de calibración específicas basadas en el procedimiento anterior
- 55

para diferentes tipos de recorridos posteriores a la recolección.

3. Un procedimiento de predicción del valor previsto de una característica de calidad específica para un producto agrícola u hortícola específico al final del recorrido posterior a la recolección, que comprende las etapas de:
  - 5 a. determinar el nivel de expresión de uno o más marcadores genéticos o la concentración de uno o más marcadores proteicos/enzimáticos en la fruta a analizar antes del recorrido posterior a la recolección (p. ej., durante la recolección) o durante el recorrido posterior a la recolección;
  - 10 b. predecir el valor previsto de la característica de calidad específica para el producto agrícola u hortícola específico después del recorrido posterior a la recolección en base a la evolución de la línea de calibración determinada de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que está concebido para dicho momento de medición específico y dicha situación posterior a la recolección específica, midiéndose la expresión génica o la concentración de proteínas en a), de modo que el valor de la característica de calidad específica predicha en base a la expresión específica o a la concentración de proteínas se puede leer en el gráfico de la línea de calibración específica.
- 15 4. Un procedimiento de predicción del valor previsto de la calidad con respecto a una característica de calidad específica para un producto agrícola u hortícola específico al final del recorrido posterior a la recolección, que comprende las etapas de:
  - a. definir el intervalo de valores que se considera aceptable para el producto agrícola u hortícola específico por el mercado para la característica de calidad específica;
  - 20 b. en base al valor para una característica de calidad específica determinada de acuerdo con la reivindicación 3 y el intervalo definido en a), considerando la calidad predicha como aceptable o no aceptable para dicha característica de calidad.
5. Un procedimiento de determinación del punto de partida en el tiempo y el punto de finalización en el tiempo del momento de recolección óptimo de un el producto agrícola u hortícola, que comprende las etapas de:
  - 25 a. determinar el perfil del nivel de expresión de uno o más marcadores genéticos o la evolución de la concentración de uno o más marcadores proteicos/enzimáticos con el coeficiente de correlación más elevado determinado de acuerdo con la etapa d) de la reivindicación 1 en el producto agrícola u hortícola, a varios puntos de tiempo en la recolección;
  - 30 b. determinar el valor de la característica de calidad específica que pertenece al valor de la actividad génica del gen o de la concentración del marcador proteico/enzimático en el recorrido de tiempo de la recolección.
  - 35 c. determinar el primer momento en el tiempo en el que se alcanza un valor de la característica de calidad específica que entra dentro del intervalo de calidad aceptable determinado en la etapa a) de la reivindicación 4 y designar este momento en el tiempo como el punto de partida en el tiempo del tiempo de recolección óptimo;
  - d. determinar el último momento en el tiempo en el que se alcanza un valor de la característica de calidad específica que entra dentro del intervalo de calidad aceptable determinado en la etapa a) de la reivindicación 4 y designar este momento en el tiempo como el punto de finalización en el tiempo del tiempo de recolección óptimo.
- 40 6. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho producto agrícola u hortícola está seleccionado del grupo que consiste en frutas, hortalizas, patatas, semillas (por ejemplo, cereales), nueces, flores cortadas, bulbos, plantas de maceta decorativas y hierbas recolectables.
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho producto agrícola u hortícola está seleccionado del grupo que consiste en manzana, pera, frutos cítricos, tales como naranja, mandarina, limón y variedad mineola, melón, tomate, melocotón, ciruela, uva, grosella, grosella silvestre, mora, frambuesa, cereza, piña, mango, kiwi, lichi, plátano, pimienta y aguacate, incluidas todas las variedades y variedades cultivadas de los mismos.
- 45 8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha característica de calidad está seleccionada del grupo que consiste en la dureza de la fruta, el dulzor de la fruta, el color de la fruta, el tamaño de la fruta, y una combinación de uno o más de los anteriores.
- 50 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la característica de calidad es la dureza de la fruta y la fruta es manzana o pera, y en el que los marcadores genéticos y/o proteicos están seleccionados del grupo que consiste en SEC ID N° 13 (M8),  $\beta$ -xilosidasa ( $\beta$ xyI), poligalacturonidasa I y II (PGI y PGII), supuesta peroxidasa de la pared celular 424/87 (87), endotransglucosilasa de xiloglucano

(XET), expansina y glucanasas tales como endo- $\beta$ -1,4-glucanasa y los genes que las codifican.

- 5
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho producto agrícola u hortícola es una hortaliza y está seleccionado de lechuga, tomate, patata, tapioca, batata, todos los tipos de col (coliflor, col rizada, coles de Bruselas, col de Milán, col cónica y similares), zanahorias (baby), zanahorias de invierno y legumbres.
11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la característica de calidad es la duración en el florero de las flores cortadas y la flor cortada es rosa, y en el que los marcadores genéticos y/o proteicos comprenden al menos el marcador lipasa con motivo GDSL, como se muestra en la SEC ID N° 28 y/o el gen que los codifica.
- 10
12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la característica de calidad es el momento de recogida óptimo de los bulbos y el bulbo es tulipán, y en el que los marcadores genéticos y/o proteicos comprenden al menos el marcador lipasa con motivo GDSL, como se muestra en la SEC ID N° 28 y/o el gen que los codifica.
- 15
13. Uso del marcador con SEC ID N° 13 (M8) para la determinación de la maduración de la fruta, preferentemente la determinación de la maduración de pera o de manzana.
14. Uso del marcador GAST para la determinación del momento óptimo de la recogida para bulbos, preferentemente tulipán.
15. Uso del marcador lipasa con motivo GDSL como se muestra en la SEC ID N° 28 para la determinación de la duración en el florero de flores cortadas, preferentemente rosas.
- 20
16. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, 14 o 15, en el que el marcador comprende, respectivamente, la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 14, 22 o 28, o una secuencia que es al menos un 70% idéntica a las mismas.
17. Anticuerpo dirigido contra la secuencia de aminoácidos de un marcador seleccionado de las secuencias de aminoácidos de SEC ID N° 22 y 28.

25

PERA CV BON CHRETIEN DURANTE LA RECOLECCIÓN EN SUDÁFRICA 2006

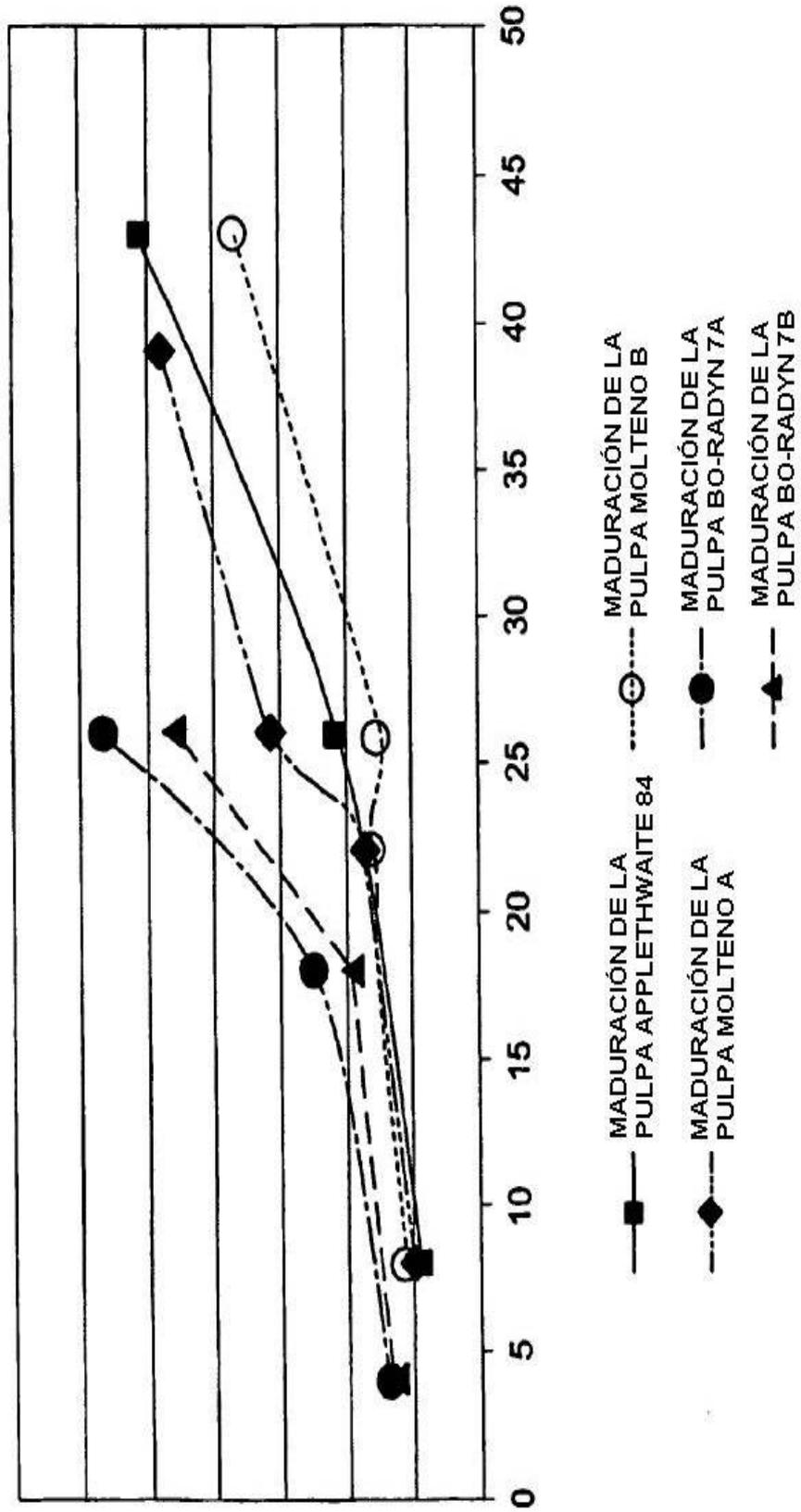


FIG. 1

MARCADOR 1 DE LA PULPA DE LA PERA CV BON CHRETIEN DURANTE LA RECOLECCIÓN FRENTE A LA FIRMEZA EOS

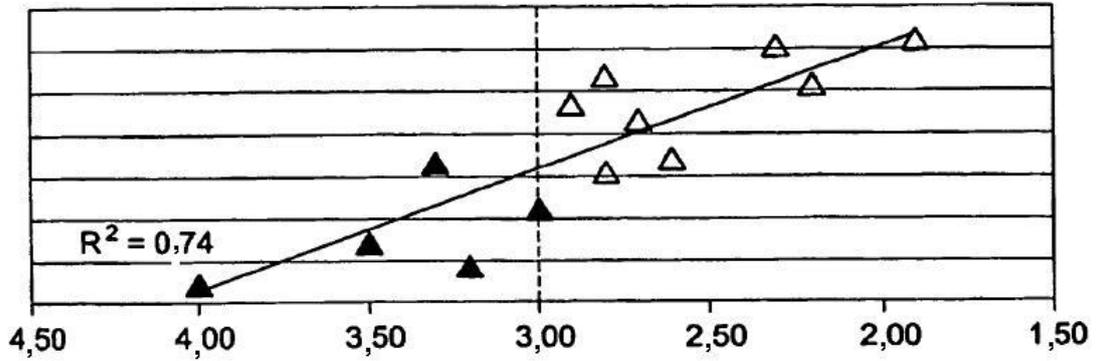


FIG. 2A

MARCADOR 6 DE LA PULPA DE LA PERA CV BON CHRETIEN DURANTE EL ALMACENAMIENTO FRENTE A LA FIRMEZA EOS

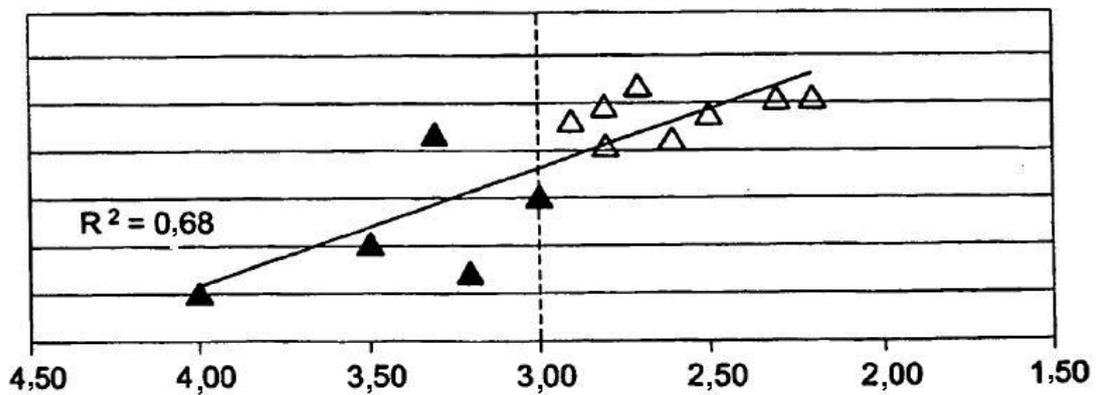


FIG. 2B

MARCADOR 3 DE LA PULPA DE PERA CV FORELLE DURANTE LA RECOLECCIÓN FRENTE A LA FIRMEZA EOS

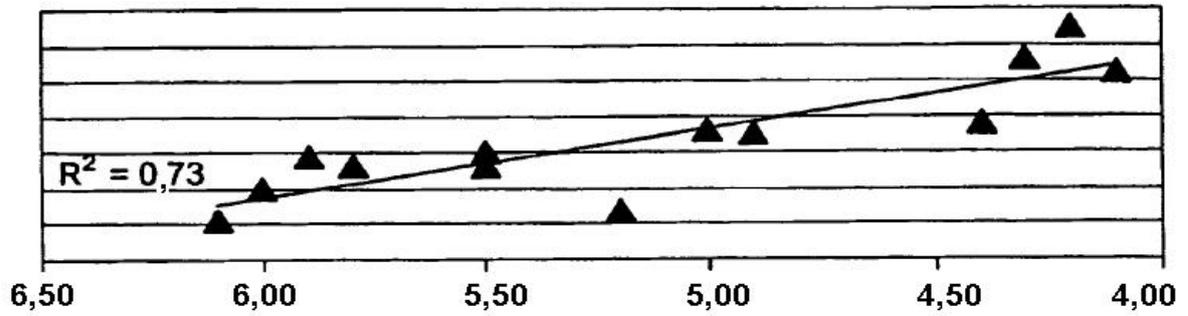


FIG. 3A

MARCADOR 1 DE LA PULPA DE PERA CV FORELLE DURANTE LA CONSERVACIÓN FRENTE A LA FIRMEZA EOS

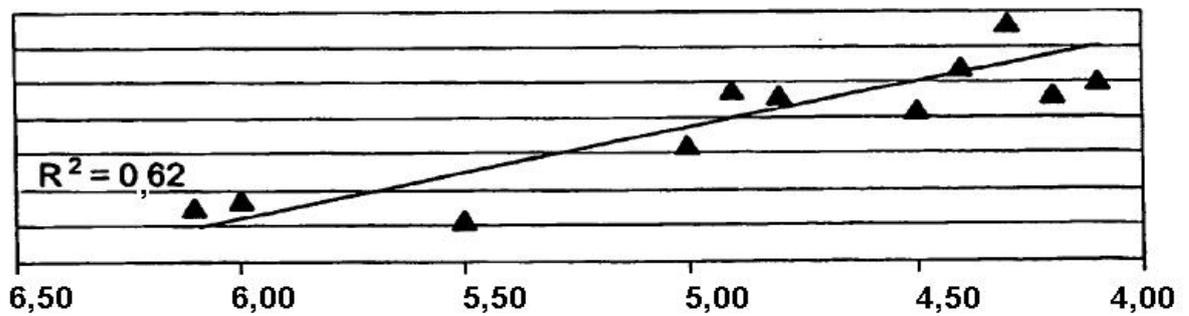


FIG. 3B

MANZANA CV GRANNY SMITH DURANTE LA RECOLECCIÓN EN SUDÁFRICA 2006

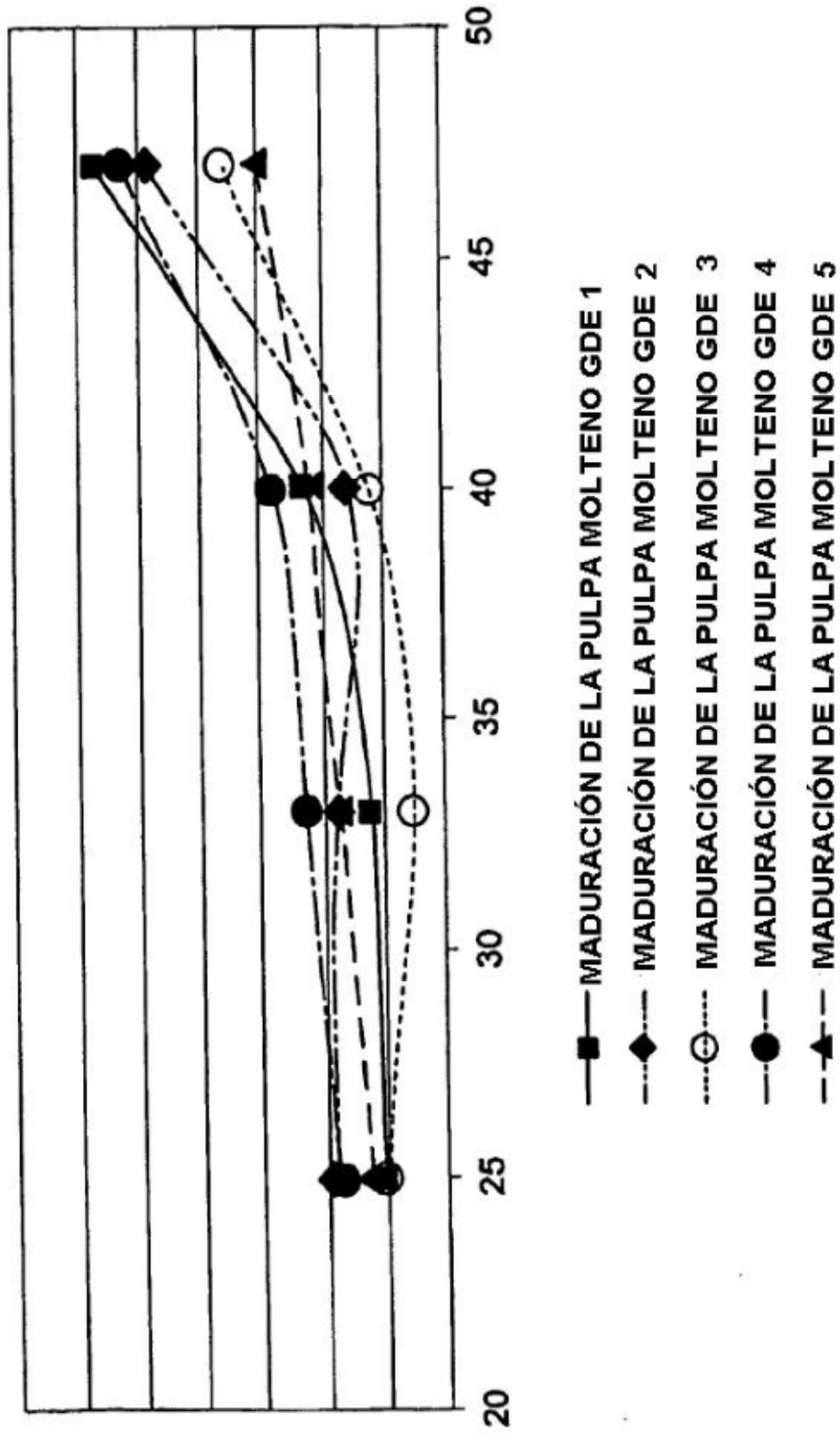


FIG. 4

MARCADOR 3 DE LA PULPA DE MANZANA CV GRANNY SMITH DURANTE LA RECOLECCION FRENTE A LA FIRMEZA EOS

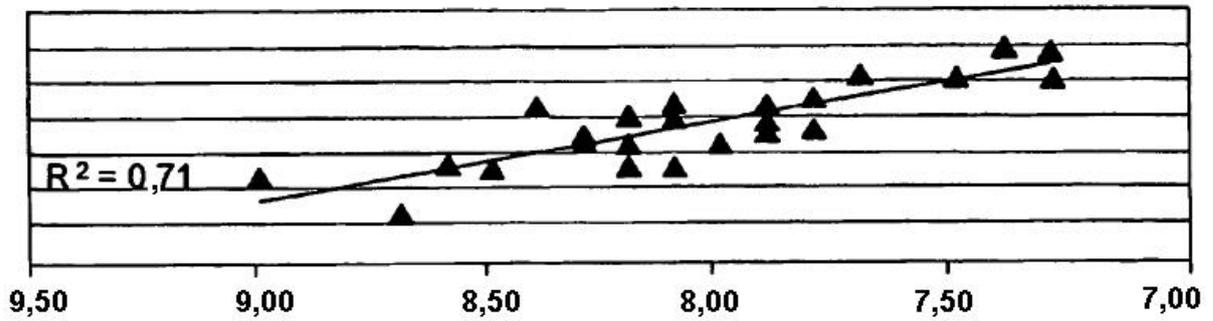


FIG. 5A

MARCADOR 3 DE LA PULPA DE MANZANA CV GRANNY SMITH DURANTE LA CONSERVACIÓN FRENTE A LA FIRMEZA EOS

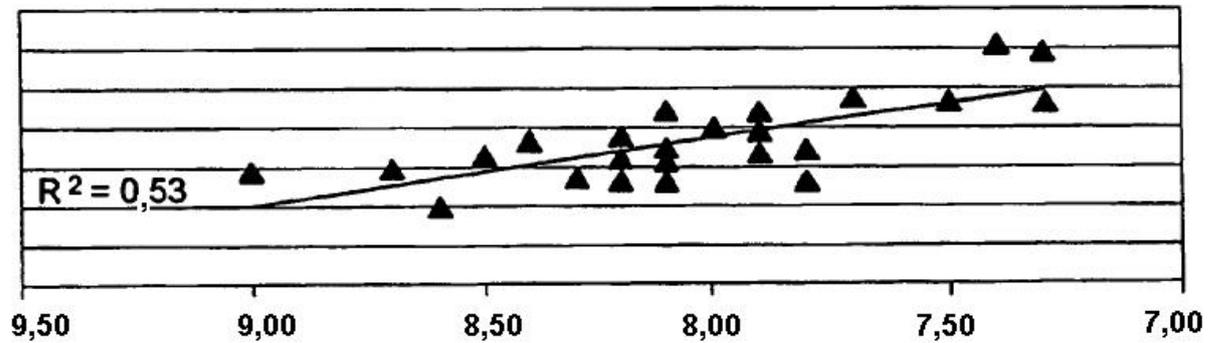


FIG. 5B

MANZANA CV GOLDEN DELICIOUS DURANTE LA RECOLECCIÓN SUDÁFRICA 2006

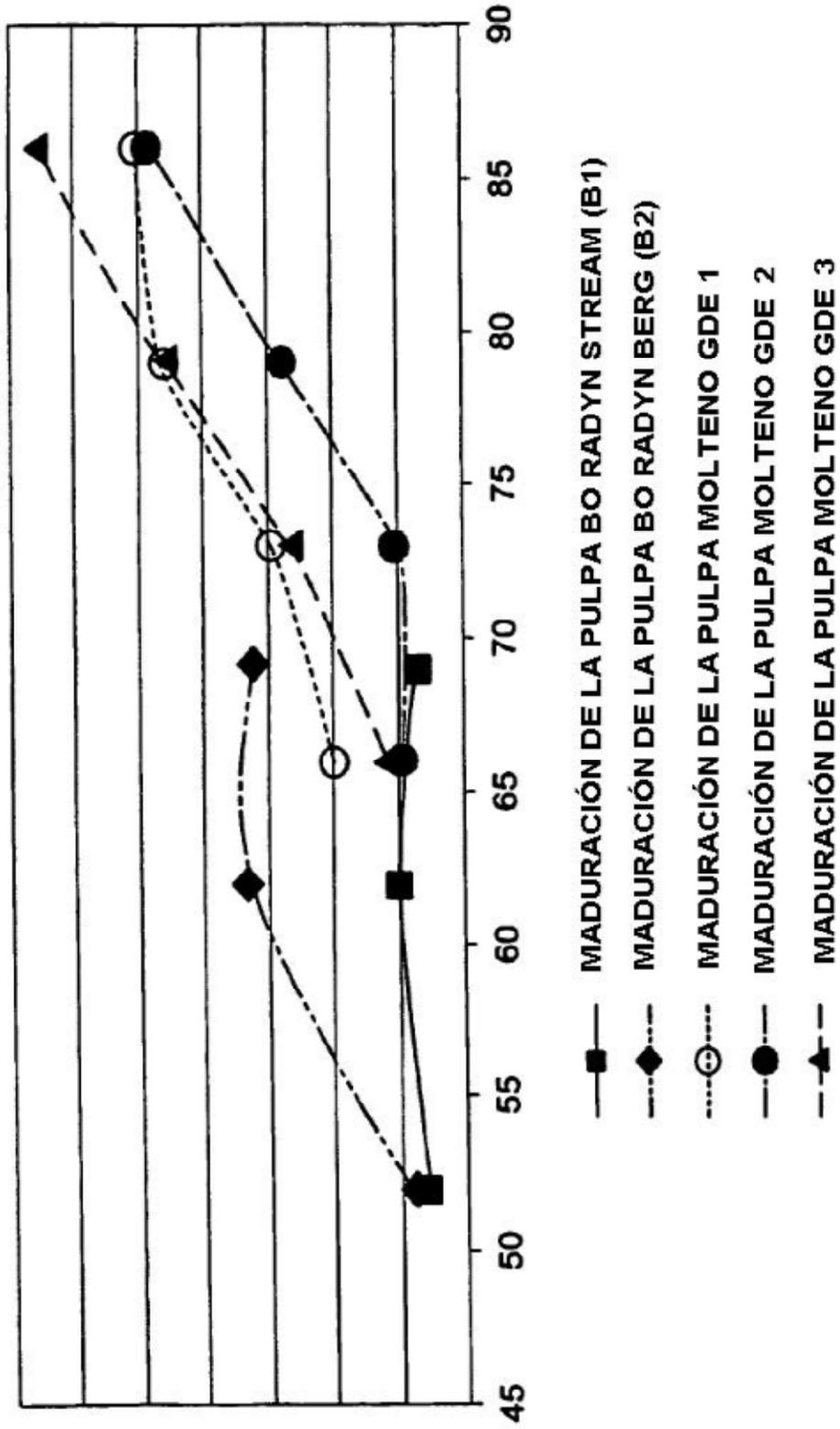


FIG. 6

MARCADOR 8 DE LA PULPA DE LA MANZANA CV GOLDEN DELICIOUS DURANTE  
EL ALMACENAMIENTO FRENTE A LA FIRMEZA EOS

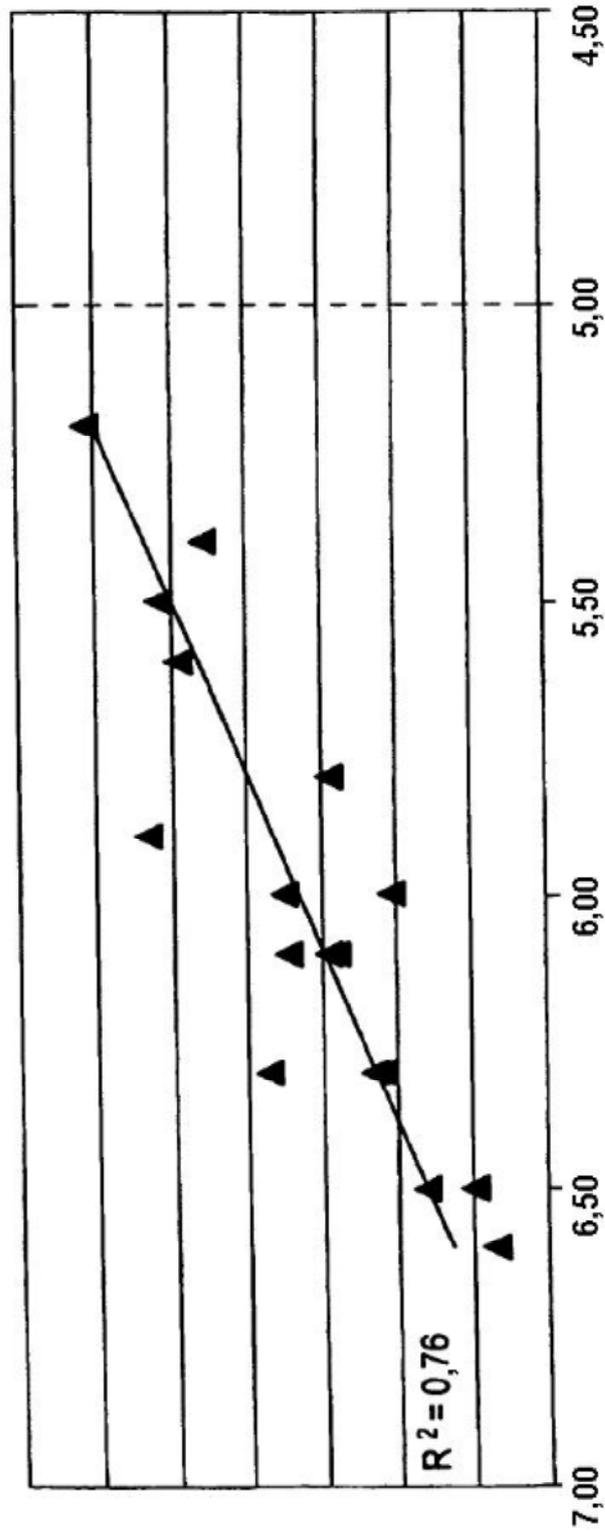


FIG. 7

MARCADOR DE LA PULPA DE MANZANA CV KANZI BETA-XILOSIDASA EN LA RECOLECCIÓN EN PAÍSES BAJOS 2006 Y 2007

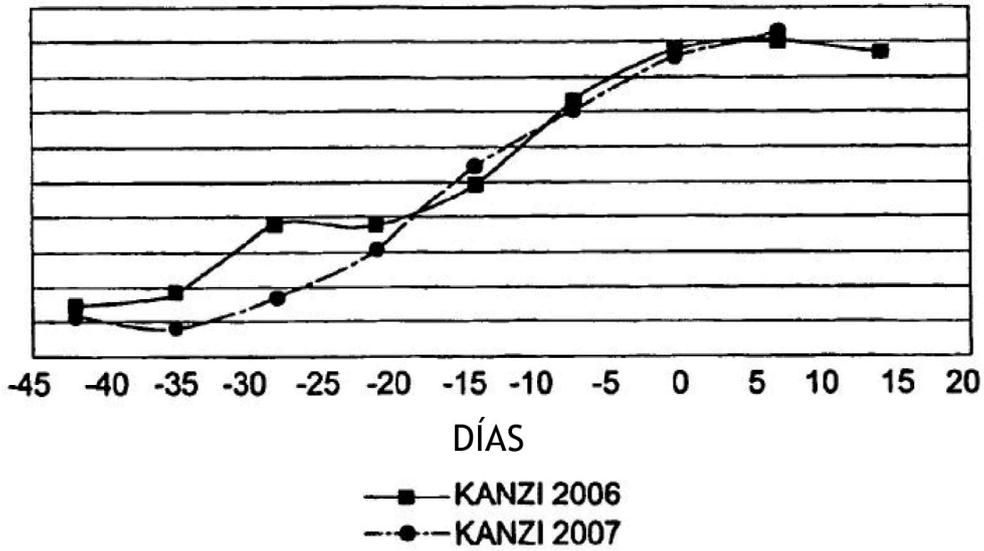


FIG. 8

MARCADOR DE LA PULPA DE MANZANA CV KANZI POLIGALACTURONASA DURANTE LA RECOLECCIÓN FRENTE A LA FIRMEZA EOS

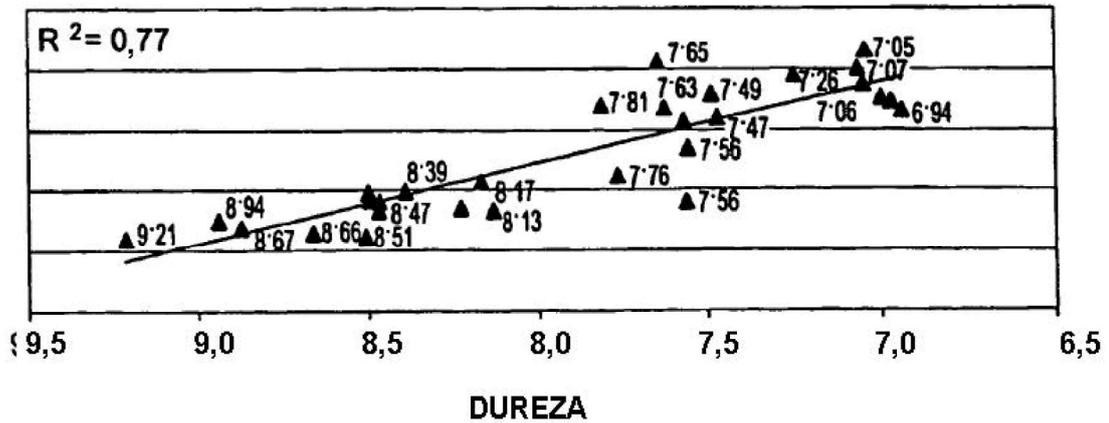


FIG. 9A

MARCADOR DE LA PULPA DE MANZANA CV KANZI BETA-XILOSIDASA DURANTE LA RECOLECCIÓN FRENTE A LA FIRMEZA EOS

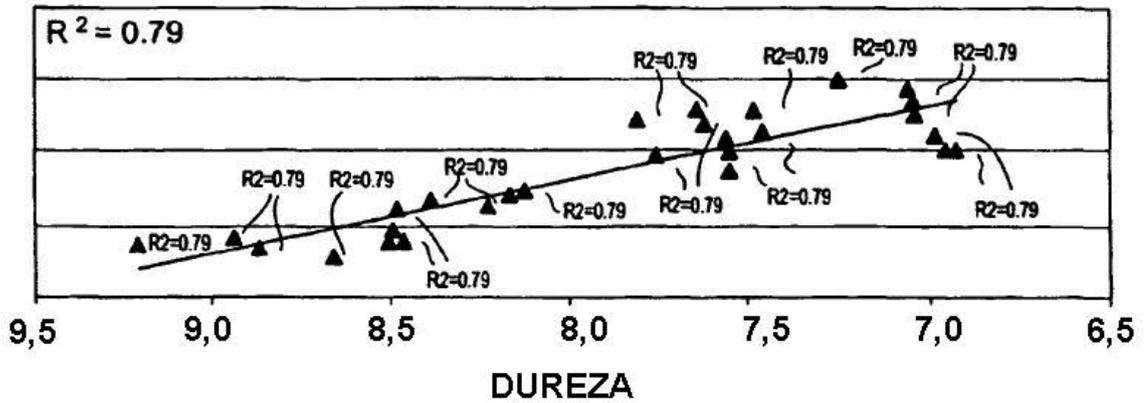


FIG. 9B

MARCADOR EN LA PERA CV CONFERENCIA EN NL POLIGALACTURONASA DURANTE LA RECOLECCIÓN FRENTE A LA FIRMEZA EOS

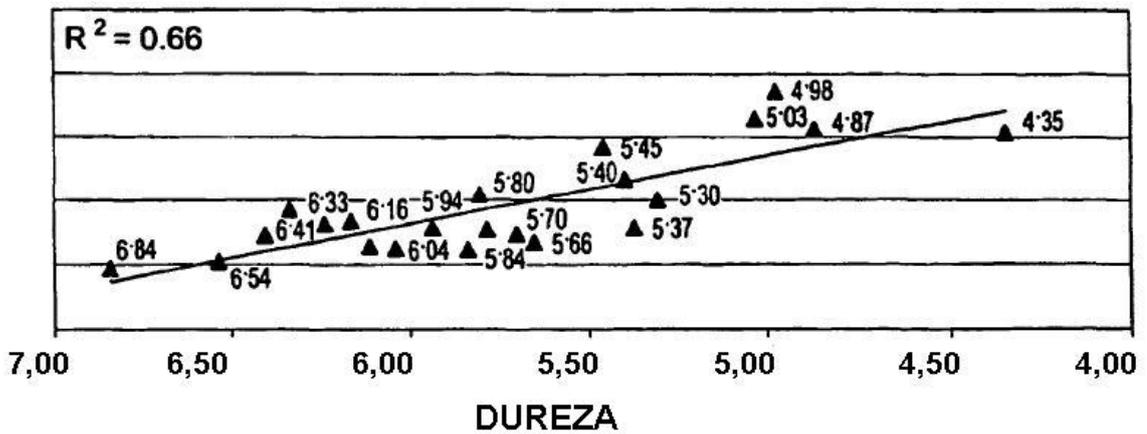


FIG. 10A

MARCADOR DE LA PERA CV CONFERENCIA EN NL BETA-XILOSIDASA DURANTE LA RECOLECCIÓN FRENTE A LA FIRMEZA EOS

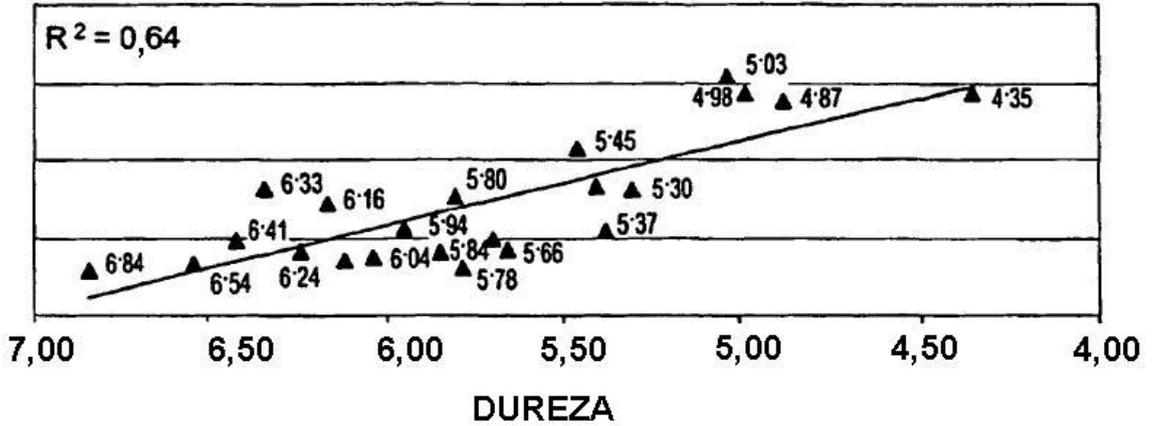


FIG. 10B

TIEMPO DE RECOGIDA DEL TULIPÁN

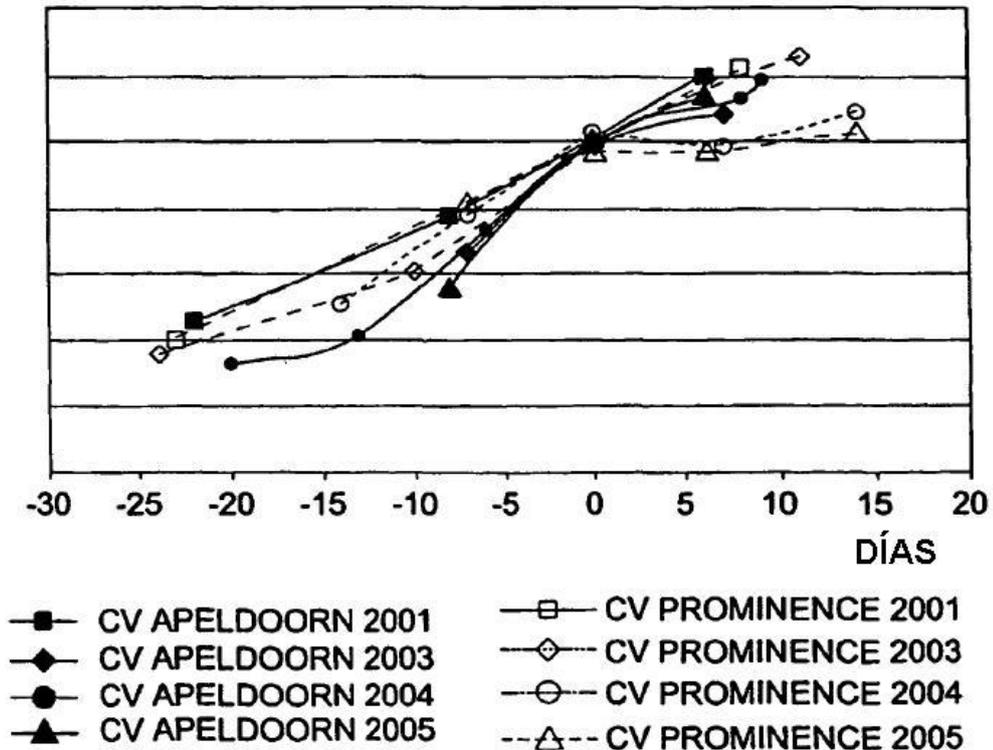


FIG. 11

PREDICCIÓN DE LA CALIDAD DE ROSAS CORTADAS

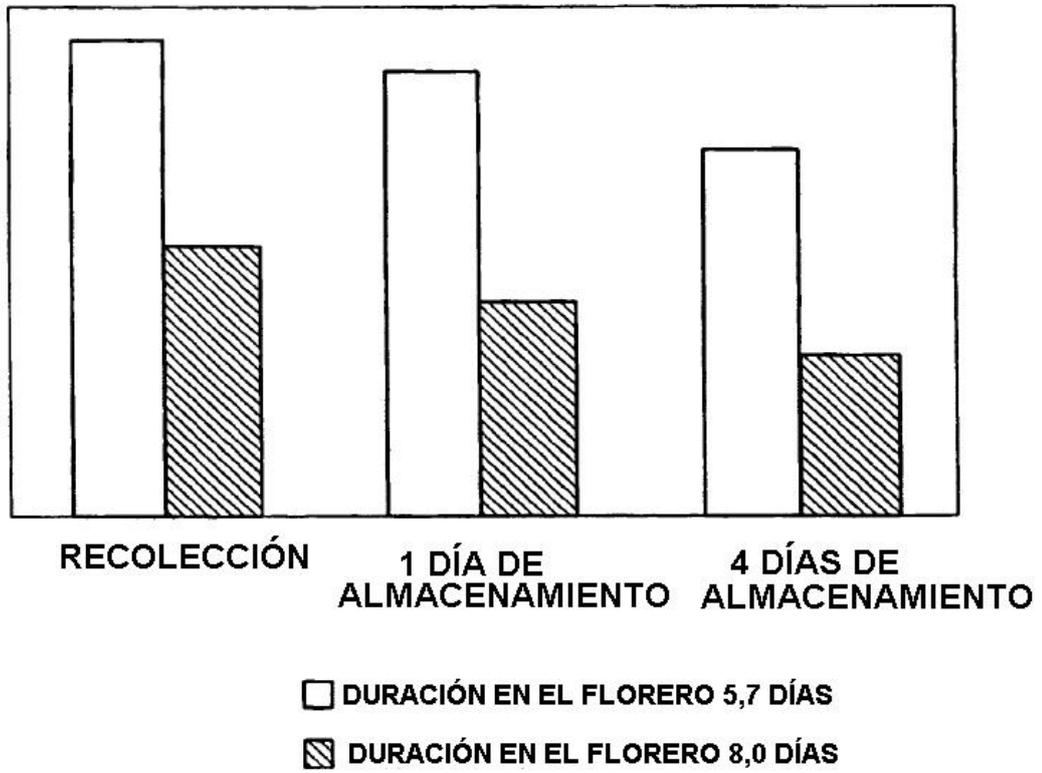


FIG. 12