

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 292**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2009** **E 09720086 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013** **EP 2255006**

54 Título: **Procedimiento para producir plantas de tomate con características de durabilidad prolongada**

30 Prioridad:

13.03.2008 ES 200800836

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

18.02.2014

73 Titular/es:

SEMILLAS FITO, S. A. (100.0%)
C/ Selva de Mar 111
08019 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

JAHRMANN, TORBEN;
GARCIA MAS, JORDI;
PUJOL ABAJO, MARTA y
FITO CASTELLS, EULALIA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 443 292 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

Procedimiento para producir plantas de tomate con características de durabilidad prolongada

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere al uso de una mutación como marcador para identificar plantas de tomate cuyos frutos presentan características de durabilidad prolongada.

10 **Antecedentes de la invención**

El tomate (*Solanum lycopersicum* L. o *Lycopersicon esculentum*) es una planta de la familia de las solanáceas (*Solanaceae*) originaria de América y cultivada en todo el mundo por su fruto comestible.

15 Dicho fruto es una baya muy coloreada, típicamente de tonos que van del amarillento al rojo, debido a la presencia de los pigmentos licopeno y caroteno. Posee un sabor ligeramente ácido, mide de 1 a 2 cm de diámetro en las especies silvestres, y es mucho más grande en las variedades cultivadas. Se produce y consume en todo el mundo tanto fresco como procesado de diferentes modos, ya sea como salsa, puré, jugo, deshidratado o enlatado.

20 El tomate es un alimento con una baja cantidad de calorías. De hecho, 100 gramos de tomate aportan solamente 18 kcal. La mayor parte de su peso es agua y el segundo constituyente en importancia son los hidratos de carbono. Contiene azúcares simples que le confieren un ligero sabor dulce y algunos ácidos orgánicos que le otorgan el sabor ácido característico. El tomate es una fuente importante de ciertos minerales como el potasio y el magnesio. De su contenido en vitaminas destacan la B1, B2, B5 y la vitamina C.

25 En el año 2005 la producción mundial de tomate ascendió a 125 millones de toneladas, siendo China el principal productor seguido de EE.UU. y Turquía.

30 La maduración de frutos carnosos como el tomate representa el estadio final del desarrollo del fruto, mediante el cual el fruto alcanza un aspecto y una palatabilidad que lo hacen apetecible para aquellos organismos que se van a encargar de la diseminación de las semillas.

35 Entre los cambios que se producen durante el proceso de maduración se pueden destacar: las modificaciones en la textura y en la ultraestructura de la pared celular, la conversión de almidón a azúcares, un incremento de la susceptibilidad al ataque por agentes patógenos después de la cosecha, alteraciones en la biosíntesis y acumulación de pigmentos, y niveles elevados de aromas y componentes volátiles.

40 El tomate alcanza sus mejores propiedades organolépticas cuando puede madurar en la planta con una buena insolación y una temperatura alta. No obstante, cuando el tomate está maduro, su consistencia se reduce. Esto se traduce generalmente en inconvenientes para su distribución en el mercado en buenas condiciones.

Los tomates modificados genéticamente para retrasar su maduración, tienden a durar más tiempo, pero tienen poco sabor y una textura más almidonosa y menos atractiva.

45 Para superar estos inconvenientes, un considerable número de esfuerzos investigadores se han dirigido hacia el estudio de las bases bioquímicas del proceso de maduración del tomate, y cuyos resultados se han publicado en numerosos trabajos científicos. Una muestra de ello es la extensa lista de referencias que figura en la patente norteamericana US6762347.

50 Entre los documentos previos en la técnica relacionados con la maduración del tomate se pueden mencionar los siguientes:

55 - En el artículo de Lincoln *et al.*, Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development, PNAS USA, 1987, 84, 2793-2797, se describe el papel que juega el etileno a nivel molecular en la maduración del tomate, ya que el tomate pertenece a un grupo de plantas que presentan una tasa de formación de etileno elevada durante su maduración, así como una actividad respiratoria elevada.

- En el artículo de J. J. Giovannoni, Curr. Op. Plant Biol., 2007, 10, 1-7, se describen las buenas perspectivas que ofrecen los tomates portadores de mutaciones para la comprensión del control de la maduración.

60 - En el artículo de Saladié *et al.*, Proc. 5th Int. Postharvest Symp, Eds. F. Mencarelli and P. Tonutti, Acta Hort. 682, ISHS, 2005, se describe que la cutícula del fruto del tomate juega un papel importante en la firmeza del fruto y en los atributos post-cosecha, ya que experimenta una modificación estructural durante la maduración, y que podría ser un importante factor del ablandamiento del fruto.

- En el artículo de Saladié *et al.*, Plant Physiology, 2007, 144, 1012-1028, se describe la contribución del metabolismo de la piel del tomate sobre la firmeza del fruto a partir de un tomate denominado DFD (del inglés *Delayed Fruit Deterioration*), cuyos frutos experimentan una maduración normal, pero permanecen firmes y no presentan pérdida de integridad durante períodos de tiempo considerables una vez alcanzado el grado de madurez.

- En el artículo de Giovannoni *et al.*, Mol. Gen. Genet., 1995, 248, 195-206, se describe la caracterización de dos zonas del genoma del tomate que son responsables de una inhibición significativa del proceso de maduración: el gen inhibidor de la maduración, denominado *rin* (del inglés *ripening inhibitor*) y el gen de la no-maduración denominado *nor* (del inglés *non ripening*).

- En el artículo de Vicente *et al.*, J. Sci. Food Agric., 2007, 87, 1435-1448, se describe la relación entre el metabolismo de la pared celular y el ablandamiento del fruto.

- En el artículo de Mendes *et al.*, Scientia agricola, 2003, 60(2), 269-275, se describe que el gen *alc* (alcobaça) ha demostrado ser altamente eficiente para incrementar la durabilidad de tomates comerciales.

- En la solicitud de patente PCT WO-A-01/14561 se describe la secuencia del gen *nor*, así como la creación de plantas transgénicas con el gen *nor*. Se describe también como las nuevas plantas presentarían alteraciones en las características del fruto y/o en su respuesta frente al etileno, y tendrían una o más características beneficiosas.

A pesar de los recursos destinados a estudiar el proceso de maduración del tomate desde un punto de vista molecular, quedan todavía incógnitas por resolver.

Otra aproximación para obtener nuevas variedades vegetales son los procesos de cruce y selección que la humanidad ha llevado a cabo durante siglos para mejorar las plantas silvestres y obtener plantas con mejores características organolépticas, con mejor rendimiento y con una menor susceptibilidad a ser atacadas por agentes patógenos.

Dichos procesos de cruce y selección son generalmente largos y laboriosos y requieren una gran experiencia por parte del horticultor para seleccionar los ejemplares que presentan el fenotipo requerido, dada la variabilidad que ocurre en los procesos naturales.

Subsiste pues la necesidad de disponer de nuevos procedimientos para el desarrollo de nuevas variedades de tomate que sean rápidos, menos laboriosos y menos dependientes de la experiencia del horticultor y que en particular permitan la obtención de tomates que tengan unas características de durabilidad prolongada.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es el uso de la mutación presente en la posición 1109 de la secuencia nucleotídica del gen *nor* del tomate como marcador para identificar plantas de tomate cuyos frutos presentan características de durabilidad prolongada, para producir plantas de tomate con dichas características, y para producir semillas que se regeneran en plantas de tomate con características de durabilidad prolongada.

También forma parte del objeto de la invención un procedimiento para identificar plantas de tomate cuyos frutos presentan características de durabilidad prolongada.

En la presente invención se describe un procedimiento para la producción de plantas de tomate cuyos frutos presentan unas características de durabilidad prolongada.

También se describe en la invención un procedimiento para la producción de semillas que tienen por resultado plantas de tomate cuyos frutos presentan unas características de durabilidad prolongada.

Figuras

Figura 1. El gen *nor* presenta 3 exones. El exón 1 consiste en 190 pares de bases y está localizado entre las posiciones 166 y 355 de la secuencia nucleotídica genómica (número de registro AY573803 en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information). El exón 2 consiste en 311 pares de bases, y se encuentra localizado entre las posiciones 983 y 1293 de la secuencia nucleotídica genómica. El exón 3 consiste en 567 pares de bases y se encuentra entre las posiciones 2163 y 2729 de la secuencia nucleotídica genómica. Al inicio de la secuencia nucleotídica del gen *nor* se encuentra la 5'UTR de 165 pares de bases entre las posiciones 1 y 165. Entre los exones 1 y 2 se encuentra un intrón de 627 pares de bases situado entre las posiciones 356 y 982. Entre los exones 2 y 3 se encuentra un intrón de 869 pares de bases situado entre las posiciones 1294 y 2162. Al final de la secuencia nucleotídica se encuentra la 3'UTR de 156 pares de bases situada entre las posiciones 2730 y 2885.

Figura 2. Fotografía correspondiente a las electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de los exones 1, 2 y 3 del gen *nor* del tomate obtenidos en el Ejemplo 1. El producto de amplificación que incluye el exón 1 tiene 524 pares de bases, el del exón 2 tiene 777 pares de bases y el del exón 3 tiene 715 pares de bases.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la invención han descubierto una mutación en la posición 1109 de la secuencia nucleotídica del gen *nor* del tomate que permite identificar plantas de tomate con frutos que presentan unas características de durabilidad prolongada, así como producir plantas de tomate con frutos que presentan dichas características y producir semillas que se regeneran en plantas de tomate cuyos frutos presentan dichas características de durabilidad prolongada.

Plantas de tomate ESL

En el contexto de la invención, las plantas de tomate cuyos frutos presentan características de durabilidad prolongada son aquellas cuyos frutos se conservan durante un período de al menos 3 meses sin necesidad de refrigeración, preferiblemente durante un período de al menos 6 meses.

Además los frutos de dichas plantas pueden mantener sus características organolépticas de jugosidad y aroma durante todo el período de post-cosecha.

En esta descripción las plantas de tomate cuyos frutos presentan características de durabilidad prolongada se denominan plantas ESL, del inglés *Extended Shelf Life*.

Uso de la mutación como marcador

El objeto de la presente invención es el uso de la mutación que consiste en la presencia de adenina (A) en lugar de timina (T) presente en la posición 1109 de la secuencia nucleotídica del gen *nor* del tomate (SEQ ID NO: 1) como marcador para identificar plantas de tomate cuyos frutos se conservan durante un período de al menos 3 meses sin necesidad de refrigeración, para producir plantas de tomate con frutos que tengan dichas características, y para producir semillas que se regeneran en plantas de tomate cuyos frutos tengan características de durabilidad prolongada.

En el curso de trabajos de investigación para desarrollar plantas de tomate con características de durabilidad prolongada, los autores de la invención han identificado un tipo de tomate autóctono con muchas variedades que presenta dichas características de durabilidad prolongada.

Los trabajos de aislamiento del ADN genómico y secuenciación del gen *nor* de diferentes variedades de tomate permitieron determinar que los tomates del tipo ESL presentaban una mutación en la posición 1109 de la secuencia nucleotídica del gen *nor* del tomate. Los tomates del tipo ESL contenían una base adenina (A) en dicha posición, mientras que otras variedades de tomate del tipo Cherry, del tipo Pintón o plantas de tomate que incorporan el gen *rin*, contenían una base timina (T).

Dicha mutación responde a un polimorfismo de un único nucleótido, que se conoce habitualmente como SNP (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*).

Un SNP es una variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando un único nucleótido (A, T, C, o G) en el genoma difiere entre miembros de una misma especie.

Se ha observado que para que se manifieste el fenotipo ESL, los dos alelos de la planta diploide deben contener en la posición 1109 del gen *nor* una base adenina (A).

El ADN genómico del gen *nor* del tomate (SEQ ID NO: 1) está registrado en la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el número de registro AY573803 y contiene 2885 pares de bases. El ARNm del gen *nor* del tomate (SEQ ID NO: 22) está registrado en dicha base de datos del GenBank con el número de registro AY573802 y contiene 1423 pares de bases.

La comparación de las dos secuencias permite concluir que el gen *nor* presenta tres exones tal como se muestra en la Figura 1. El exón 1 consta de 190 pares de bases y está localizado entre las posiciones 166 y 355 de la secuencia nucleotídica. El exón 2 consta de 311 pares de bases, y se encuentra entre las posiciones 983 y 1293 de la secuencia nucleotídica. El exón 3 consta de 567 pares de bases y se encuentra entre las posiciones 2163 y 2729 de la secuencia nucleotídica. Al inicio de la secuencia nucleotídica del gen *nor* se encuentra la 5'UTR de 165 pares de bases entre las posiciones 1 y 165. Entre los exones 1 y 2 se encuentra un intrón de 627 pares de bases situado entre las posiciones 356 y 982. Entre los exones 2 y 3 se encuentra un intrón de 869 pares de bases situado entre

las posiciones 1294 y 2162. Al final de la secuencia nucleotídica se encuentra la 3'UTR de 156 pares de bases situada entre las posiciones 2730 y 2885.

5 La secuenciación del gen *nor* se ha llevado a cabo siguiendo procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo usando el kit BigDye Terminator[®] de la compañía Applied Biosystems.

Dicho procedimiento incluye las siguientes etapas: extracción del ADN genómico de plantas de tomate de diferentes variedades, amplificación del amplicón correspondiente al gen *nor* y secuenciación del mismo.

10 La extracción del ADN genómico se puede efectuar por ejemplo de acuerdo con el procedimiento descrito en el artículo de Doyle *et al.*, Focus, 1990, 12, 13-15.

15 La amplificación del ADN genómico se puede llevar a cabo mediante el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa, que es conocida habitualmente como PCR.

Para amplificar el gen *nor* presente en el ADN genómico extraído los autores de la invención diseñaron cebadores específicos para amplificar las secuencias nucleotídicas correspondientes a los exones 1, 2 y 3.

20 En el Ejemplo 1 de esta descripción se incluyen las secuencias nucleotídicas de los cebadores que se emplearon para dicha amplificación.

En el caso del exón 2, y debido a la longitud del mismo, se emplearon dos cebadores externos y dos cebadores internos en dos amplificaciones consecutivas para conseguir la amplificación apropiada de la zona deseada.

25 La secuenciación del ADN genómico amplificado se puede efectuar por ejemplo empleando el kit BigDye Terminator[®] v 1.1 de la compañía Applied Biosystems.

30 Las secuencias amplificadas de los exones 1, 2 y 3 de diferentes variedades de tomate se alinearon para identificar eventuales polimorfismos. Se comprobó que en los exones 1 y 3 no existía polimorfismo entre los tomates del tipo ESL y las otras variedades de tomate del tipo Cherry y del tipo Pintón.

35 Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, se comprobó que en la posición 1109 de la secuencia nucleotídica del gen *nor*, que se encuentra en la zona correspondiente al exón 2, los tomates del tipo ESL presentaban una mutación en dicha posición. Los tomates del tipo ESL contenían una base adenina (A) en dicha posición, mientras que otras variedades de tomate del tipo Cherry, del tipo Pintón, o las que incorporan el gen *rin*, contenían una base timina (T).

40 Al efectuar la traducción de la secuencia nucleotídica a proteína, se observó que dicha mutación causaba un cambio de aminoácido en la posición 106 de la proteína correspondiente. El genotipo T codifica para un aminoácido valina (no polar) y el genotipo A para un aminoácido ácido aspártico (polar).

Procedimiento para identificar plantas de tomate ESL

45 El otro aspecto del objeto de la presente invención es un procedimiento para identificar plantas de tomate cuyos frutos presentan características de durabilidad prolongada caracterizado porque comprende la etapa de identificar la presencia en ambos alelos de la base adenina (A) en la posición 1109 de la secuencia nucleotídica del gen *nor* del tomate (SEQ ID NO: 1).

50 En el procedimiento de la invención, la identificación de las plantas de tomate se lleva a cabo mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia como por ejemplo el kit de detección SNaPshot[®], PCR a tiempo real empleando sondas del tipo Taqman[®] de la compañía Applied Biosystems, o bien del tipo Hyprobes[®] de la compañía Roche[®], o cualquier otra tecnología de detección de polimorfismos SNP.

55 En dicho procedimiento se emplean unos cebadores específicos que se describen en el Ejemplo 2 y que permiten identificar las plantas de tomate que contienen el SNP en la posición 1109 de la secuencia nucleotídica del gen *nor* del tomate.

Procedimiento para producir plantas de tomate ESL

60 También se describe en la invención un procedimiento para producir plantas de tomate cuyos frutos presentan unas características de durabilidad prolongada que comprende:

a) proporcionar una planta de *Solanum lycopersicum* con alelos que contienen una base adenina en la posición 1109 del gen *nor* del tomate (SEQ ID NO: 1),

b) cruzar la planta proporcionada en la etapa a) con material de cultivo de *Solanum lycopersicum*, que presenta un genotipo AA o AT en la posición 1109 del gen *nor* del tomate,

c) recolectar las semillas resultantes del cruce de la etapa b),

d) regenerar las semillas en plantas, e

e) identificar y seleccionar las plantas que contienen en ambos alelos el genotipo A empleando el marcador de la etapa a).

En una realización del procedimiento de la invención se cruzó una planta de tomate ESL (planta autóctona cuyos frutos presentaban características de durabilidad prolongada), que contenía alelos que contenían una base adenina en la posición 1109 del gen *nor* del tomate, y que consecuentemente presentaba un genotipo AA, con una planta de tomate de otra variedad, por ejemplo del tipo Cherry o Pintón, que presentaba un genotipo TT en lo que se refiere a dicha posición.

De dicho cruce se obtuvieron semillas F1 que se regeneraron en una planta de tomate. Se procedió a la extracción del ADN genómico de una planta F1 y se procedió a la identificación de la base que se encontraba en la posición 1109 del gen *nor* de dicha planta tal como se describe en el Ejemplo 2. Se observó que dicha planta F1 era un híbrido que presentaba un genotipo AT.

En una etapa ulterior, se pueden recoger semillas F2 de las plantas obtenidas por autofecundación, y proceder a la extracción del ADN genómico de varias plantas F2 e identificar la base que se encuentra en la posición 1109 del gen *nor* de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

Con el uso del SNP o marcador identificado por los autores de la presente invención se pueden producir plantas de tomate cuyos frutos combinan las características de durabilidad prolongada con otras características fenotípicas interesantes desde el punto de vista comercial, como por ejemplo el tamaño, la forma, el color o la textura del fruto.

Así, por ejemplo, se pueden producir tomates con características de durabilidad prolongada (ESL) que presentan características del tomate del tipo Cherry empleando el procedimiento de la invención. Para ello se puede cruzar una línea parental de tomate ESL que presenta el genotipo AA en la posición 1109 del gen *nor*, con una línea parental de tipo Cherry que presenta el genotipo TT en dicha posición. De esta forma se obtiene una F1 que presenta un genotipo AT. Al cruzar el híbrido F1 con una línea parental ESL se obtiene una F2 y se pueden seleccionar las plantas que presentan el genotipo AA empleando el marcador de la invención. Empleando el procedimiento de retrocruce o retrocruzamiento, bien conocido por el experto en la materia, y el marcador de la invención para seleccionar las plantas con genotipo AA, se pueden obtener líneas parentales con características de durabilidad prolongada (ESL) y otras características interesantes comercialmente como las del tomate Cherry.

Procedimiento para producir semillas de plantas de tomate ESL

También se describe un procedimiento para producir semillas que tienen por resultado plantas de tomate cuyos frutos presentan unas características de durabilidad prolongada que comprende las etapas:

a) proporcionar una planta *Solanum lycopersicum* con alelos que contienen una base adenina en la posición 1109 del gen *nor* del tomate SEQ ID NO: 1,

b) cruzar la planta proporcionada en la etapa a) con material de cultivo de *Solanum lycopersicum*, que presenta un genotipo AA o AT en la posición 1109 del gen *nor* del tomate,

c) recolectar las semillas resultantes del cruce de la etapa b), e

d) identificar y seleccionar las semillas empleando el marcador de la etapa a) que contienen en ambos alelos el genotipo A.

Sorprendentemente, se ha encontrado que los frutos de las plantas de tomate que contienen en ambos alelos una base adenina (A) en la posición 1109 del gen *nor* presentan unas características de durabilidad prolongada, de modo que se pueden conservar durante un período de al menos 3 meses, y generalmente de al menos 6 meses sin necesidad de refrigeración, con lo que disminuyen los costes de almacenamiento y de transporte, y asimismo el fruto mantiene sus características organolépticas de jugosidad y aroma durante todo el período de post-cosecha.

Procedimiento para producir plantas de durabilidad prolongada (ESL) mediante transgénesis.

Aunque la planta con la mutación en homocigosis presenta las características más interesantes, como las descritas

en los ejemplos de la presente invención, una planta puede contener una mutación que tenga la base adenina (A) en la posición 1109 del gen *nor* en homocigosis, heterocigosis o hemicigosis.

Como se mencionó antes, la planta puede obtenerse mediante cruzamiento, es decir, empleado el polen de la planta homocigótica para el polimorfismo que presenta una base adenina en la posición 1109 del gen *nor* para polinizar cualquier otra planta que no contiene dicha mutación en las secuencias del gen *nor*, mediante polinización del gineceo de las plantas que contienen la secuencia mutada de la invención con otros pólenes de plantas que no contienen esta secuencia, o pueden obtenerse mediante transformación genética mediante biobalística, infección con *Agrobacterium* o cualquier otra técnica conocida por el experto en la materia que permita la integración de cualquiera de las secuencias de la invención en el ADN de la planta, ya sea nuclear, cloroplástico o mitocondrial.

También se describe el uso de:

a) La SEQ ID NO: 1 que presenta una base adenina (A) en la posición 1109, en lugar de una base timina (T),

b) una secuencia homóloga a la secuencia nucleotídica de (a) que presenta una base adenina (A) en la posición homóloga a la 1109, o

c) una construcción genética (denominada a partir de ahora construcción genética de la invención) que incluye la secuencia nucleotídica de acuerdo con a), b), o cualquiera de sus combinaciones,

para producir plantas de durabilidad prolongada (ESL).

Puede esperarse que el grado de identidad/similitud de las secuencias homólogas a la recopilada en la secuencia SEQ ID NO: 1 es, en diferentes especies del género *Solanum* y dentro de las diferentes variedades y subespecies de *Solanum lycopersicum* L., al menos del 80% o superior y, más preferiblemente, al menos del 85%, 90, 95 o 99%. La correspondencia entre las secuencias de nucleótidos de las secuencias adoptivas y la secuencia recogida en SEQ ID NO: 1 puede determinarse mediante procedimientos conocidos en la materia. Los procedimientos para comparar las secuencias son bien conocidos en el estado de la técnica e incluyen, entre otros, el programa BLASTP o BLASTN y el programa FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1999)). Preferiblemente las diferencias (mutaciones) presentadas por la secuencia nucleotídica homóloga a la SEQ ID NO: 1 se presentan en regiones no codificantes, sin afectar al producto de la expresión de dicha secuencia.

El término «homología», como se usa en esta descripción, se refiere por tanto a la semejanza entre dos estructuras debido a un ascendente evolutivo común y, más específicamente, a la semejanza entre dos o más secuencias nucleotídicas o aminoácídicas. Puede considerarse que las secuencias homólogas, con una identidad de al menos el 80% con la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1, la cual presenta una base adenina (A) en la posición homóloga a 1109, tendrían la misma función.

La construcción genética de la etapa c) de la invención, no se corresponde con un sistema de expresión génica o un vector que comprende la SEQ ID NO: 1, que presenta la base adenina (A) en la posición 1109 del gen *nor* en lugar de timina (T), o la secuencia homóloga a SEQ ID NO: 1 que presenta una base adenina (A) en la posición homóloga a 1109, unida de forma operativa a al menos un promotor que dirige la transcripción de dichas secuencias nucleotídicas y con secuencias necesarias o apropiadas adicionales para la transcripción y su regulación adecuada con respecto al tiempo y localización, por ejemplo, señales de inicio y parada, sitios de corte de la señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores de la transcripción (*potenciadores*), silenciadores de la transcripción (*silenciadores*), etc.

Se puede obtener un gran número de estas construcciones, sistemas o vectores de expresión mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia y son parte de la presente invención.

Un «vector» es un replicón, o un vector integrado, al que se une otro segmento polinucleotídico para llevar a cabo la replicación y/o expresión del segmento unido.

Un «replicón» es todo elemento genético que actúa como una unidad autónoma de replicación polinucleotídica dentro de una célula, la cual es capaz de replicarse por sí misma.

Un vector de integración es todo elemento genético que se integra en el genoma de una célula y se mantiene estable.

«Secuencia de control» se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para llevar a cabo la expresión de las secuencias a las que están unidas. Según se usa en este documento, el término «promotor» se refiere a una región anterior en la secuencia de ADN con respecto al punto inicial de la transcripción y, en particular, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula vegetal, independientemente de si el origen del promotor es

vegetal o no.

Unido de forma «operativa» se refiere a una yuxtaposición donde los componentes descritos de esta forma tienen una relación que les permite trabajar de una forma intencionada. Una secuencia control «unida de forma operativa» a una secuencia que se transcribe en secuencia nucleotídica de la invención se une de forma que la expresión de la secuencia codificante se alcanza en condiciones compatibles con las secuencias control.

Una «secuencia codificante» es una secuencia polinucleotídica que se transcribe en ARNm y/o se traduce en un polipéptido cuando está bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas.

En la invención además se describe un proceso para producir plantas de tomate cuyos frutos presentan algunas características de durabilidad prolongada que comprende:

a) transfección de la SEQ ID NO: 1 que presenta una base adenina (A) en la posición 1109, en lugar de una base timina (T), una secuencia homóloga a la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, que presenta una base adenina (A) en la posición homóloga a 1109, o una construcción genética que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 que presenta una base adenina (A) en la posición 1109 (o una secuencia homóloga a la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, que presenta una base adenina (A) en la posición homóloga a 1109) en una célula o cultivo de células huésped vegetales,

b) crecimiento de la célula o el cultivo de células huésped vegetales en medios adecuados hasta la regeneración de una planta completa.

En esta descripción «transfección» o «transgénesis» se entiende como un procedimiento para transferir ADN no propio a un organismo que, de este modo, se empieza a denominar «transgénico».

El término «transgénico» se usa en el contexto de la presente invención para describir plantas en las que se ha incorporado una secuencia de ADN no propio, en una forma preferiblemente estable y, específicamente, los polinucleótidos o construcciones genéticas de la invención.

Preferiblemente, la célula huésped transfectada puede clasificarse taxonómicamente como miembro del género *Solanum*. Más preferiblemente, la célula transfectada puede clasificarse taxonómicamente como miembro de la especie *Solanum lycopersicum*.

Un «huésped», «célula huésped» o «célula hospedadora» según se utiliza en esta descripción se refiere a un organismo, célula o tejido, especialmente una célula vegetal, que se usa como diana o recipiente para los elementos transfectados (por ejemplo, polinucleótidos o construcciones genéticas de la invención):

Con «planta» en esta descripción, se entienden todos los organismos que pueden clasificarse dentro del reino *Viridiplantae*, incluyendo las algas verdes y las plantas terrestres (*Embryophyta*). Los organismos del género *Solanum* pertenecen al superreino *Eukaryota*, reino *Viridiplantae*, filo *Streptophyta*, subclase *Asteridae*, orden *Solanales* y familia *Solanaceae*. *Solanum lycopersicum* es el nombre científico de la planta del tomate.

Los términos «polinucleótido» y «ácido nucleico» se usan en este documento de forma indistinta en referencia a formas poliméricas nucleotídicas de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (RNA o ARN) como desoxirribonucleótidos (DNA o ADN).

Los términos «secuencia aminoacídica», «péptido», «oligopéptido», «proteína» y «polipéptido» se usan en este documento de manera indistinta, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede o no estar química o bioquímicamente modificada.

La célula transformada con un vector que incluye la SEQ ID NO: 1, que presenta la base adenina (A) en la posición 1109 del gen *nor* en lugar de timina (T), puede incorporar la secuencia en uno de los ADN de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico, o permanecer como parte de un vector que tiene su propia maquinaria para la autorreplicación.

Más preferiblemente, la célula transformada con un vector que incluye la SEQ ID NO: 1, que presenta la base adenina (A) en la posición 1109 en lugar de timina (T), o una secuencia homóloga a la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 1, que presenta una base adenina (A) en la posición homóloga a la 1109 en lugar de una base timina (T), puede incorporar la secuencia en uno de los ADN de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico en forma estable. Los procedimientos para la incorporación de un ácido nucleico exógeno en el genoma de una célula vegetal en forma estable son conocidos en el estado de la técnica.

Las células transformadas, si son vegetales, pueden colocarse en un programa de organogénesis somática o

embriogénesis mediante el cual, tras la desdiferenciación de las mismas con una adecuada combinación de hormonas vegetales y de otros compuestos, darán lugar a una planta completa que contiene el material genético de la célula original de la que proviene.

- 5 Los ejemplos que siguen a continuación se exponen a efectos de proporcionar al experto en la materia una explicación detallada de realizaciones concretas dentro de la invención.

Ejemplo preparativo.- Extracción del ADN genómico de las plantas de tomate

- 10 El procedimiento empleado para extraer el ADN genómico de las plantas de tomate coincide sustancialmente con el procedimiento descrito en Doyle *et al.*, Focus, 1990, 12, 13-15.

Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de plantas de tomate del tipo ESL, del tipo Cherry, del tipo Pintón, y de plantas de tomate que incorporaban el gen *rin* en su genoma.

- 15 Se colocó una hoja joven en un tubo eppendorf de 1,9 ml, y se sumergió en nitrógeno líquido. A continuación se trituraron las hojas, se añadieron 500 µl de la solución tampón de extracción Doyle calentada previamente a 65° C, y se agitó suavemente.

- 20 La muestra se mantuvo en un baño de agua a 65° C durante 30 minutos.

Pasado este período de tiempo se añadió rápidamente una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 24:1 volumen/volumen.

- 25 Se centrifugó a 11.000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se transfirieron 200 µl de la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf.

Se añadieron 350 µl de alcohol isopropílico a 4° C a la fase acuosa, y se mezcló suavemente hasta la formación de hilos de ADN.

- 30 Se centrifugó a 10.000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante con una pipeta. En la parte inferior del eppendorf se encontraba un precipitado blanquecino que era el ADN extraído.

- 35 A dicho precipitado se añadieron 200 µl de tampón de lavado Doyle, se centrifugó a 10.000 rpm a temperatura ambiente durante 3 minutos, y se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido se secó, y se resuspendió en 50 µl de agua tipo HPLC. Se mantuvo toda la noche a 4° C, y posteriormente se guardó a -20° C. Dicha suspensión se empleó para efectuar la secuenciación de los exones del gen *nor* de cada uno de los tomates ensayados.

El tampón de extracción de Doyle y el tampón de lavado de Doyle se encuentran descritos en el artículo de Doyle *et al.*, ya mencionado.

- 40 **Ejemplo 1.-Secuenciación de los exones del gen *nor* del tomate**

- 45 La secuenciación de los exones del gen *nor* de diferentes tipos de tomate se llevó a cabo mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los exones de dicho gen, y a continuación se procedió a su secuenciación, previa amplificación y marcado.

Se llevó a cabo la secuenciación de ADN genómico de plantas de tomate del tipo ESL, del tipo Cherry, del tipo Pintón y de plantas de tomate que incorporaban el gen *rin* en su genoma.

- 50 1.- Amplificación de los exones

- Para amplificar cada uno de los tres exones del gen *nor* del tomate se mezclaron 0,5 µl (equivalentes a 20-100 ng) de ADN genómico obtenido en el Ejemplo preparativo, 15 µl de agua destilada, 2,5 µl de tampón de PCR concentrado 10 veces (AmpliTaQ 10x PCR buffer II, Applied Biosystems), 2,5 µl de solución MgCl₂ 25 mM (AmpliTaQ MgCl₂ Solution, Applied Biosystems), 2 µl de dNTPs 5 mM, 1 µl de una solución del cebador F específico por cada exón a 10 µM, 1 µl de una solución del cebador R específico por cada exón a 10 µM, y 0,5 µl de ADN Polimerasa Taq (Applied Biosystems).

- 60 Se ejecutó el programa del termociclador AB9700 de Applied Biosystems de acuerdo con la siguiente secuencia: 1 minuto a 94° C; 35 repeticiones del ciclo de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 60° C, 90 segundos a 72° C, finalizando con un ciclo de 5 minutos a 72° C.

Finalizada la amplificación, ésta se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa siguiendo métodos bien conocidos por el experto en la materia.

Los cebadores que se emplearon para la amplificación de los tres exones del gen *nor* del tomate se muestran en la Tabla I:

TABLA I

Exón	Referencia	Secuencia del cebador	SEC ID N.º
1	Cebador F externo	TCATTTTCTCTCTTCCCAAAAA	3
	Cebador R externo	CATGAAGATTAAAAAGGGGAAA	4
2	Cebador F externo	TCCACGATAACGTGTAAAAAGTG	5
	Cebador R externo	TTTTCATCAAAAATTGAAAGTTGA	6
	Cebador F externo	TTCGGAGAGCAAGAATGGTT	7
	Cebador R externo	CAACCAAGTGGCTTGTTATTG	8
3	Cebador F externo	AACTCGAATAAATTCAATGTTTCAT	9
	Cebador R externo	TCGATTGATTTTACAGGGCTAA	10

- 5 En el caso del exón 2, que tiene 777 pares de bases, se efectuaron dos amplificaciones: en primer lugar con los dos cebadores externos, y en segundo lugar con los cebadores internos.

En la Figura 2 se observa el resultado de la electroforesis del gel de agarosa para los exones 1, 2 y 3 del gen *nor* del tomate.

- 10 Antes de proceder a la amplificación y marcado de las secuencias de los exones para efectuar su secuenciación, eventualmente se puede llevar a cabo una purificación de las mismas mediante el empleo del kit High Pure PCR Product Purification Kit[®] de Roche Applied Science.

15 2.- Secuenciación de los exones

La secuenciación de los tres exones se llevó a cabo mediante el empleo del kit de secuenciación BigDye Terminator[®] v1.1 de la compañía Applied Biosystems.

- 20 Se efectuó la secuenciación de cada uno de los ADN genómicos que se obtuvieron de diferentes tipos de tomate del Ejemplo preparativo después de ser amplificados por PCR con los cebadores descritos en la Tabla I.

- 25 Se colocaron 4 µl del producto de PCR de los tres exones como se describe en el apartado 1 del Ejemplo 1, 2 µl del reactivo BigDye Terminator[®] (Applied Biosystems), 1 µl de una solución del cebador externo específico por cada exón a 3,2 mM, y 3 µl de agua destilada.

Se ejecutó el siguiente programa en el termociclador AB9700: 25 ciclos de 10 segundos a 96° C, 5 segundos a 50° C, y 4 minutos a 60° C.

- 30 Siguiendo las instrucciones del proveedor del kit, esto se precipitó con una mezcla de etanol, EDTA y acetato sódico.

El precipitado obtenido se resuspendió en tampón de inyección de la compañía Applied Biosystems, y la suspensión se cargó en el secuenciador automático ABI PRISM 3130 de la compañía Applied Biosystems, y se ejecutó el programa de secuenciación.

- 35 Los datos de secuenciación se analizaron empleando el programa informático GeneMapper[®] de la compañía Applied Biosystems.

Se observó que el tomate del tipo ESL contenía en la posición 1109 del gen *nor*, concretamente en el exón 2 de

dicho gen, una timina (T), mientras que tomates del tipo Cherry, del tipo Pintón, o aquellos que incorporaban el gen *rin* en su genoma tenían una adenina (A) en dicha posición.

- 5 Al efectuar la traducción de la secuencia nucleotídica a proteína, se observó que dicha mutación causaba un cambio de aminoácido en la posición 106 de la proteína correspondiente. El genotipo T codifica para un aminoácido valina (no polar), y el genotipo A para un aminoácido ácido aspártico (polar).

Ejemplo 2.- Identificación de tomates del tipo ESL

- 10 La identificación de tomates del tipo ESL se llevó a cabo mediante el empleo de la técnica PCR de acuerdo con el procedimiento que se describe a continuación en el que se emplean unos cebadores diseñados para poder identificar rápidamente la base que se encuentra en la posición 1109 del exón 2 del gen *nor* del tomate.

- 15 En primer lugar se extrajo el ADN genómico de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo preparativo. A continuación se mezclaron 0,5 µl de ADN genómico correspondientes a 20-100 ng, 15 µl de agua, 2,5 µl de tampón de PCR concentrado 10 veces (AmpliTaq 10x PCR buffer II, Applied Biosystems), 2,5 µl de una solución de MgCl₂ 25 mM (AmpliTaq MgCl₂ Solution, Applied Biosystems), 2 µl de dNTPs 5 mM, 1 µl de una solución del cebador F (SEQ ID NO: 7) 10 µM, 1 µl de una solución del cebador R (SEQ ID NO: 8) 10 µM, y 0,5 µl (2,5 u) de ADN Polimerasa Taq (AmpliTaq® - Applied Biosystems).

- 20 La amplificación se llevó a cabo en un termociclador AB9700, de acuerdo con la siguiente secuencia: 1 ciclo de un minuto a 94° C; 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 60° C, y 30 segundos a 72° C; para terminar con un ciclo de 5 minutos a 72° C.

- 25 Se comprobó que la amplificación era correcta mediante electroforesis en un gel de agarosa siguiendo métodos bien conocidos por el experto en la materia.

- Se transfirieron 2,5 µl del producto amplificado a un nuevo tubo y se añadió 1 µl de ExoSAP-IT de la compañía Applied Biosystems. Se mezcló y se aplicó un golpe de centrifuga.

- 30 A continuación, el producto se incubó en un termociclador durante 15 minutos a 37° C, y durante 15 minutos a 80° C.

- 35 Para llevar a cabo la reacción SNaPshot se mezclaron 1,5 µl del ADN obtenido, 1,25 µl del reactivo Mix SNaPshot (Applied Biosystems), 0,5 µl de una solución del cebador interno (SEQ ID NO: 11) 2 µM, y 1,75 µl de agua HPLC (Panreac).

El cebador interno utilizado en esta etapa tenía la secuencia 5'- TACCGGAACCGACAAGCCGG -3' (SEQ ID NO: 11).

- 40 Se ejecutó la PCR con la siguiente programación del termociclador: 25 ciclos de 10 segundos a 96° C, 5 segundos a 50° C, y 30 segundos a 60° C, y finalmente se mantuvo a 4° C.

Se añadieron 1 µl de fosfata de intestino de ternera (1u/µl) (CIP), se agitó y se aplicó un golpe de centrifuga.

- 45 Se incubó en un termociclador durante 1 hora a 37° C, 15 minutos a 75° C, y se mantuvo a 4° C.

A continuación 0,5 µl del producto obtenido se cargó en una placa de secuenciación junto con 12 µl de formamida HI-DI, y 0,5 µl del reactivo LIZ 500 size standard.

- 50 Se desnaturalizó durante 5 minutos a 95° C, se enfrió la placa con hielo y se aplicó un golpe de centrifuga.

Se cargó el secuenciador automático AB3130 (SNP, matriz E5, módulo FragmentAnalysis36_POP7_1) y se analizaron los datos con el programa informático GeneMapper® de la compañía Applied Biosystems.

- 55 En la Tabla II se presentan los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento de la invención a diferentes líneas de tomate:

TABLA II

Línea de tomate	Genotipo	Fenotipo	Período de durabilidad	Color del fruto
1	TT	Cherry	10 días	Rojo
2	AA	ESL	> 6 meses	Naranja
3	TT	Pintón	10 días	Rojo
4	TT	Pintón	10 días	Rojo
5	TT	Pintón	10 días	Rojo
6	AT	Híbrido	30 días	Rojo
7	TT	rin	60 días	Amarillo
8	TT	rin	60 días	Amarillo
9	TT	rin	60 días	Amarillo
10	TT	rin	60 días	Amarillo
11	AA	ESL	> 6 meses	Naranja
12	AA	ESL	> 6 meses	Naranja
13	AA	ESL	> 6 meses	Naranja
14	AA	ESL	> 6 meses	Naranja
15	AA	ESL	> 6 meses	Naranja
16	AA	ESL	> 6 meses	Naranja
17	AA	Híbrido F1	> 6 meses	Naranja
18	AA	Híbrido F1	> 6 meses	Naranja
19	AA	Híbrido F1	> 6 meses	Naranja

Se puede observar que los tomates del tipo ESL, que tienen un genotipo AA en la posición 1109 del gen *nor*, presentan un período de durabilidad superior a los 6 meses, mientras que los tomates que presentan un genotipo TT no presentan dicha característica.

Tampoco presentan las características de durabilidad prolongada los híbridos AT obtenidos a partir de una línea parental ESL con un genotipo AA y una línea parental con un genotipo TT.

Las líneas híbridas 17 a 19 se han obtenido a partir de dos líneas parentales que presentan el genotipo AA.

Ejemplo 3.- Producción de tomates del tipo ESL

Se tomó una planta de tomate del tipo ESL que tenía el genotipo AA en la posición 1109 del gen *nor*, y se cruzó con una planta de tomate del tipo Cherry que tenía el genotipo TT en dicha posición.

Se obtuvo una primera generación F1 que se sometió al ensayo de identificación descrito en el Ejemplo 2, y se observó que presentaban un genotipo híbrido AT.

El cruce de una planta de tomate del tipo ESL con el híbrido AT conduce a la obtención de plantas, y mediante el empleo del marcador de la invención se seleccionan aquellas que presentan características de durabilidad prolongada (ESL) con el genotipo AA en la posición 1109 del gen *nor*.

Mediante el empleo de la técnica de retrocruce o retrocruzamiento, bien conocida por el experto en la materia, se pueden obtener líneas parentales ESL que presentan características de otros tipos de tomate por ejemplo Cherry.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Semillas Fitó, S.A.	
5	<120> Procedimiento para producir plantas de tomate con características de durabilidad prolongada	
	<130> EP2096.3	
	<140> EP2255006	
10	<141> 06/09/2010	
	<150> PCT/EP2009/052912	
	<151> 12/03/2009	
15	<160> 11	
	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
20	<211> 2885	
	<212> ADN	
	<213> Solanum lycopersicum	
	<400> 1	
25	ctaaattcct tctgtttat catttctct ctcccaaaa aaaaatccca aaatttaac	60
	ataatacaat tcgaatttat caacctcgta ctacgtacat attttgttg gtacgtaaaa	120
	tactgaattc aggtcaactc aaacatcgta aattgtgatt tctttatgga aagtacggat	180
30	tcatacaaccg ggacacgtca tcagcctcaa ctcccaccgg ggtttcgatt ccacccgacg	240
	gacgaagaac tcacgtcca ctacctcaa aaacgagtcg ccggcgctcc gattccggtg	300
35	gatattattg gtgaaattga tctttataag ttgatccat gggaactccc tgctactatt	360
	ttcaccacta tactatattt tctgcccta taacttatat ataggggaaa aagatcggag	420
	tcagcgatga acaattattg tgtctaaatt aaattttaa tatgcaatag attggtgacg	480
40	aatttcgttg ctaattaatt ttttagtgat aaattaatat tttccctt ttaattctc	540
	atgttttta tcacaaagt ttctatgacc aactataaa gattgaact cgatcaatt	600
45	ttttttaga atgaatgaac ttatgttata tatagtata tttaaagtc tttttatat	660
	ttcaaaaga tatccacgat aacgtgtaaa aagtgaattt gcaaaaaaaaa aatgtagtac	720
	ctttattta atttattgt agataattta gattttaatt ttgaattgt tata	780
50	ttctgaatcg tataatattt atttaatttc ttttttga gttttttt ggagggtgct	840
	taaaaagtag tattcacaaa tataaagtag tggacaaaca taaagtagtg gaccataat	900
55	ttatttttt aaaaattata taaaactat ttgttaagt taaattctga attatctct	960
	tatcatgtgt ttaacgcagc taaggcaata ttcggagagc aagaatggtt ctttttagt	1020
	ccaagagata gaaaatatcc taacggggcg aggccaaatc gggctgcaac atcgggttat	1080
60	tggaaggcta ccggaaccga caagccggtt ttacttccg gtggaacaca aaaggttggg	1140
	gtaaaaagg cgctcgttt ttacggcggt aaaccaccaa aaggggtaaa aactaattgg	1200

	atcatgcatg aatacagagt ttagaaaaat aaaacaaata acaagccact tgggtgtgat	1260
	aatttcttg ccaacaaaaa aggatcttg agggtaagtc cttaaatttg catcgaaact	1320
5	aatttctcta tcgtatcaga tagggataag atatacgtat actctaact cctgaacca	1380
	cacaagtact atactagata tgggtgttg gtagatgact tgattcaact ttcaaattt	1440
10	tgatgaaaat gtttaagtta tatataccat atatatatag gcgtagctaa aaatttcgat	1500
	aaggggggtt aaatctgaaa aaatggatat acgaaatagc cgaaagaggt tcgacataga	1560
	ttattttaac catataaaaa taatacaatt ttcatatata tatacgccgt ggtaatatg	1620
15	aggaatattt tatactatta atgtacttta accaggggagc gctctagagt tgatgaaccc	1680
	tctcagcgaa aatttacgtt gtatatttaa ggtacctttt aataattttt gtatttatat	1740
20	attaatttg aacctctga atataagatt agacgttgac ttagtggtt caggggttca	1800
	aatcactatt cttttttcc taaccccctt aatgaaaac ctgaatcggc cactaactt	1860
	aactggttat agaagggtta tctactaga aaaaagcatg aaattctaac cgacaaagat	1920
25	gtagtcgcc agttagataa gacgtttaaa ttgggcggat agagttactt tattttcac	1980
	tgtcatatgt tactatatat tgacacttca cttaaagagt tatcatatcg atattttac	2040
30	tattagtga cataacacaa actcgaataa attcaatgtt tcatagcta gtaattagt	2100
	ctaactttt taacaaaaaa tatttttctt actccacact attttattt attttttgc	2160
	agctagatga ttgggtttta tgcgaattt acaagaagaa taacacacaa aggtccatag	2220
35	atgatttga tgatatgtg ggtatgatac caaaaatgt accaaattca atattacaag	2280
	gaataaagcc ttcaaactat ggtacaatat tgctcgaaaa tgaatcgaat atgtacgatg	2340
40	gaattatgaa taacacgaac gatattatca acaataataa tagatccatt ccacaaatat	2400
	cgtaaaagag aacgatgcat ggagggttgt attggaataa cgacgaagca acaacaaca	2460
	caacaactat ttagtagaac catttccaa atacaaaaag gttcctgtt gagaacaacg	2520
45	aggacgatgg acttaacatg aataatatt cgcaattac aaatcatgaa caaagtagct	2580
	ccattgccaa ttctctgagc cagtttctc aaaatcctc gattcaacaa caacaacaac	2640
50	aacaagaaga agtattggga tctctaatg atggggctgt ctttcgacaa ccttataatc	2700
	aagttactgg catgaattgg tactctaaa gatataaaaa ggcaaaaaat agttagccct	2760
	gtaaaatcaa tcgatcaatc aatcatagat atattatata tggattcgt tatattttac	2820
55	tttagttag aattaatata tagaatatct tctatctcac attaacaat aagaacatt	2880
	ataac	2885
60	<210> 2	
	<211> 1423	
	<212> ADN	
	<213> Solanum lycopersicum	
	<400> 2	

	ctaaattcct tctgtttat cattttctct ctcccaaaa aaaaaatccc aaaattta	60
	cataatacaa ttcgaattta tcaacctcgt actacgtaca ttttttgg ggtacgtaa	120
5	atactgaatt cagggtcaact caaacatcgt aaattgtgat ttctttatgg aaagtacgga	180
	ttcatcaacc gggacacgct atcagcctca actcccaccg gggtttcgat tccacccgac	240
10	ggacgaagaa ctcatcgtcc actacctcaa aaaacgagtc gccggcgctc cgattccggt	300
	ggatattatt ggtgaaattg atctttataa gtttgatcca tgggaactcc ctgctaaggc	360
	aatattcgga gagcaagaat ggttctttt tagtccaaga gatagaaaat atcctaacgg	420
15	ggcggaggcca aatcgggctg caacatcggg ttattggaag gctaccggaa cgcacaagcc	480
	ggttttact tccggtggaa cacaaaaggt tggggtaaaa aaggcgctcg tttttacgg	540
20	cggtaaacca ccaaaagggg taaaaactaa ttggatcatg catgaataca gagttgtaga	600
	aaataaaaca aataacaagc cacttggttg tgataatatt gttgccaaca aaaaaggatc	660
	tttgaggcta gatgattggg tttatgtcg aatttacaag aagaataaca cacaaaggtc	720
25	catagatgat ttgatgata tgttgggac gataccacaa aatgtaccaa attcaatatt	780
	acaaggaata aagcctcaa actatggtac aatattgctc gaaaatgaat cgaatatgta	840
30	cgatggaatt atgaataaca cgaacgatat tatcaacaat aataatagat ccattccaca	900
	aatatcgtca aagagaacga tgcattggagg tttgtattgg aataacgacg aagcaacaac	960
	aacaacaaca actattgata ggaaccattc tcaaataca aaaaggttc ttgtgagaa	1020
35	caacgaggac gatggactta acatgaataa tatttcgcga attacaaatc atgaacaaag	1080
	tagtctcatt gccaatctc tgagccagtt tctcaaaaat ccttcgattc aacaacaaca	1140
40	acaacaacaa gaagaagtat tgggatctct taatgatggg gtcgtcttc gacaacctta	1200
	taatcaagtt actggcatga attggtactc taaagatat aaaaaggcaa aaaatagtta	1260
	gccctgtaaa atcaatcgt caatcaatca tagatatatt atatatggat ttcgttatat	1320
45	tttactttta gttagaatta atatatagaa tatcttctat ctacattaa caaataagaa	1380
	catttataac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa	1423
50	<210> 3 <211> 22 <212> ADN <213> Solanum lycopersicum	
55	<400> 3 tcattttctc tctcccaaa aa	22
60	<210> 4 <211> 22 <212> ADN <213> Solanum lycopersicum	
	<400> 4 catgaagatt aaaaagggga aa	22

	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Solanum lycopersicum	
5	<400> 5	
	tccacgataa cgtgtaaaaa gtg	23
	<210> 6	
10	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Solanum lycopersicum	
	<400> 6	
15	tttcatcaa aaattgaaa gttga	25
	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Solanum lycopersicum	
	<400> 7	
	ttcggagagc aagaatggtt	20
25	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Solanum lycopersicum	
30	<400> 8	
	caaccaagtg gctgttatt tg	22
	<210> 9	
	<211> 25	
35	<212> ADN	
	<213> Solanum lycopersicum	
	<400> 9	
	aactcgaata aattcaatgt tcat	25
40	<210> 10	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Solanum lycopersicum	
45	<400> 10	
	tcgattgatt ttacagggt aa	22
	<210> 11	
50	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Solanum lycopersicum	
	<400> 11	
55	taccggaacc gacaagccgg	20
	1	

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de la mutación que consiste en la presencia de adenina, A, en lugar de timina, T, presente
- 5 a. en la posición 1109 de la secuencia nucleotídica del gen *nor* del tomate SEQ ID NO: 1 o
- b. en la posición correspondiente con respecto a la posición 1109 de SEQ ID NO: 1, de secuencias que tienen una identidad de al menos el 80% con SEQ ID NO: 1,
- 10 como marcador para identificar plantas de tomate que tienen el genotipo AA, cuyos frutos, que presentan características de durabilidad prolongada, se conservan durante un periodo de al menos 3 meses sin necesidad de refrigeración.
- 15 2.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que adicionalmente se selecciona la planta de tomate identificada que presenta el genotipo AA en la posición 1109 como se describe en la reivindicación 1a o 1b.
- 3.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que adicionalmente se selecciona al menos una semilla de la planta de tomate identificada que presenta el genotipo AA en la posición 1109 como se describe en la reivindicación 1a o 1b.
- 20 4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la planta de tomate se clasifica taxonómicamente dentro de la especie *Solanum lycopersicum*.



Figura 1

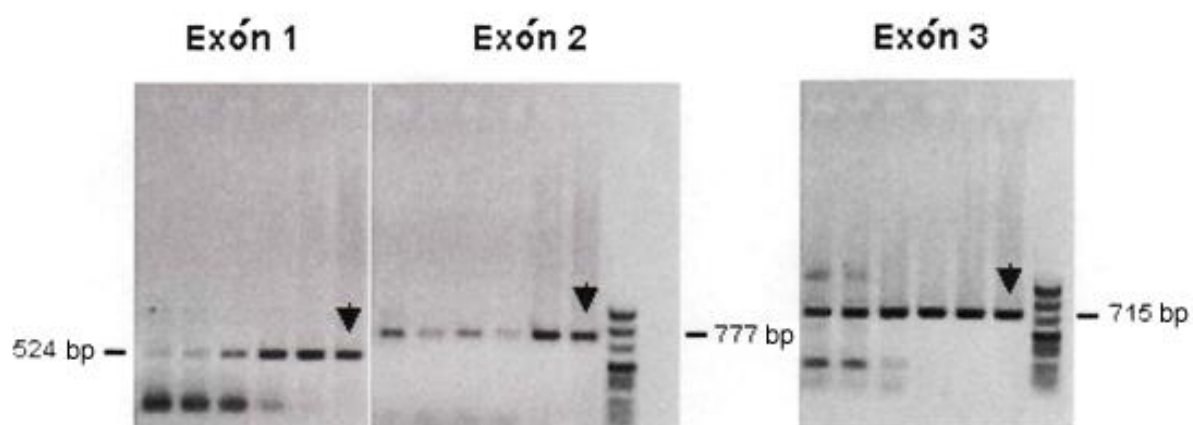


Figura 2