

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 280**

51 Int. Cl.:

A01H 4/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2009 PCT/NZ2009/000182**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.03.2010 WO10024699**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2009 E 09810283 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2328402**

54 Título: **Métodos y composiciones para aumentar la vida de almacenamiento de la fruta**

30 Prioridad:

29.08.2008 NZ 57088608

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

31.10.2016

73 Titular/es:

**THE NEW ZEALAND INSTITUTE FOR PLANT AND
FOOD RESEARCH LIMITED (100.0%)
Mt Albert Research Centre 120 Mt Albert Road
Mt Albert, Auckland, NZ**

72 Inventor/es:

**ATKINSON, ROSS GRAHAM;
SCHAFFER, ROBERT JAMES;
GUNASEELAN, KULARAJATHEVAN y
SCHRÖDER, ROSWITHA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 588 280 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

Métodos y composiciones para aumentar la vida de almacenamiento de la fruta

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para producir plantas con fruta con elevada vida de almacenamiento.

10 Técnica anterior

El deterioro poscosecha es un problema importante para la industria frutícola. Se ha estimado que el 10-20 % de la fruta poscosecha se pierde mediante deterioro antes de llegar a los consumidores. Este deterioro produce elevado coste de la fruta no deteriorada para el consumidor. Además, la fruta es frecuentemente desechada por el consumidor debido al deterioro después de la compra, pero antes de comerse la fruta.

Una de las causas principales del deterioro es la maduración natural de la fruta. A medida que la fruta madura, tiende a estar más blanda y más susceptible al daño mecánico, además de al daño biológico de los patógenos necrofíticos tales como las podredumbres del almacenamiento.

Además de los problemas asociados al ablandamiento, la carne de frutas tales como las manzanas frecuentemente desarrolla una textura seca "harinosa" durante el almacenamiento poscosecha, que es poco popular para los consumidores. Se cree que la textura harinosa es un resultado de la separación de células en la carne cuando la fruta se muerde, sin ruptura asociada de células y liberación del zumo de manzana. Esto crea la impresión de una manzana seca menos jugosa, además de una manzana menos crujiente o crocante

La pérdida de agua de la fruta durante el almacenamiento también es un problema y puede conducir a que la fruta desarrolle un aspecto reseco poco atractivo.

Se han usado diversos enfoques para intentar tratar el deterioro poscosecha de la fruta. Por ejemplo, los enfoques genéticos se han centrado en manipular la expresión de genes de la síntesis de etileno tales como ACC oxidasa (por ejemplo, en manzana, Schaffer et al 2007; tomate, Hamilton et al 1990; y melón, Ayub et al 1996) y ACC sintasa (Oeller et al 1991) y en genes que influyen en la fisiología de la pared celular tales como pectina liasa (Santiago-Doménech et al 2008), expansina (Brummell et al 1999) y β -galactosidasa (Carey et al 2001). Sin embargo, a conocimiento de los solicitantes, ninguna fruta resultante de tales enfoques está actualmente comercialmente disponible.

Se comercializaron tomates transgénicos en los que se redujo la expresión de un gen de poligalacturonasa (PG) como los tomates bien documentados Flavr Savr. Sin embargo, problemas técnicos dificultaron supuestamente el transporte de los delicados tomates GE sin daño. Finalmente se retiró la venta de tomates Flavr Savr.

Un ejemplo de un tomate transgénico tal se facilita por Kramer et al "Postharvest evaluation of Transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: processing, firmness and disease resistance", POSTHARVEST BIOLOGY AND TECHNOLOGY. (19920301), vol. 1, no. 3, PÁGINA 241 - 255.

Desde una perspectiva científica, la fruta de tomate con niveles alterados de poligalacturonasa se ha estudiado ampliamente. La fruta de tomate que contiene un gen de PG antisentido (pTOM6) mostró despolimerización reducida de los polímeros de pectina en fruta (Smith et al., 1990). Sin embargo "la firmeza de la fruta durante toda la maduración no se alteró en las muestras transgénicas cuando se comparó con controles" (Schuch et al 1991). El agrietamiento poscosecha, tasas de infección, y la capacidad de resistir al transporte, mejoraron en los tomates PG antisentido. Muchos otros estudios en estas líneas transgénicas soportan la función de PG en la despolimerización de la pectina, pero no el ablandamiento de la fruta (Carrington et al 1993, Cantu et al 2008; Langley et al 1994, Powell et al 1993)

La expresión en exceso de PG en el fondo del mutante inhibido por la maduración *rin* restauró la actividad de PG y la degradación de pectina en fruta. Sin embargo, no se detectó efecto significativo sobre el ablandamiento de la fruta, desprendimiento de etileno o desarrollo de color. Los autores informaron que la "poligalacturonasa fue el primer determinante de la degradación de poliuronida de la pared celular, pero sugirieron que esta degradación no era suficiente para la inducción de ablandamiento" (Giovannoni et al., 1989).

Experimentos adicionales en los que el gen pTOM6 se expresó en exceso en tabaco (*Nicotiana tabacum*; Osteryoung et al., 1990) mostraron que la proteína del tomate se procesó adecuadamente y se localizó en las paredes celulares de las hojas en el tabaco. La enzima mostró actividad cuando se extrajo de hojas de tabaco transgénico y se probó contra extractos de pared celular del tabaco *in vitro*. Sin embargo, no se observaron cambios en el fenotipo de la hoja, ni hubo alteraciones a las pectinas en las paredes celulares del tabaco *in vivo*.

Experimentos adicionales en los que el gen pTOM6 se expresó en exceso en tabaco (*Nicotiana tabacum*; Osteryoung et al., 1990) mostraron que la proteína del tomate se procesó adecuadamente y se localizó en las paredes celulares de las hojas en el tabaco. La enzima mostró actividad cuando se extrajo de hojas de tabaco transgénico y se probó contra extractos de pared celular del tabaco *in vitro*. Sin embargo, no se observaron cambios en el fenotipo de la hoja, ni hubo alteraciones a las pectinas en las paredes celulares del tabaco *in vivo*.

Juntos estos resultados sugirieron a los investigadores que PG solo tuvo función en la despolimerización de pectina principalmente en fruta, pero la enzima no tuvo un efecto sobre el ablandamiento de la fruta.

5 Así, a pesar de tal considerable investigación, el problema del ablandamiento poscosecha no se ha vencido para la mayoría de las frutas y particularmente en manzana. La manzana (*Malus domestica* Borkh. cv Royal Gala) madura de forma muy diferente al tomate y muchas otras frutas debido a que el hinchamiento de la pared celular no es una de las modificaciones de la pared celular que se producen durante la maduración de la manzana (Redgwell et al., 1997). Hay mínimo cambio en la viscosidad de las paredes celulares, y solubilización o degradación de pectina mínima durante la maduración de la fruta. Por tanto, sería beneficioso proporcionar métodos mejorados o
10 alternativos para tratar el ablandamiento poscosecha en manzanas y otras frutas.

15 Wakasa et al ("Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential", POSTHARVEST BIOLOGY AND TECHNOLOGY., (200602), vol. 39, no. 2, PÁGINA 193 - 198) investigaron cómo los patrones de ablandamiento se diferenciaban entre cultivares usando análisis de transferencia Northern y análisis cuantitativo en tiempo real por RT-PCR. Concluyeron que los cultivares que quedan firmes revelaron expresión muy débil o transitoria de *MdPG1*, independientemente de la velocidad de producción de etileno y los niveles de transcripción de otros genes.

20 Es un objetivo de la invención proporcionar métodos y composiciones mejorados para producir plantas con fruta que tiene elevada vida de almacenamiento poscosecha, o al menos para proporcionar al público una elección útil.

Sumario de la invención

25 En un primer aspecto la invención proporciona un método de aumento de la vida de almacenamiento poscosecha y la firmeza de la fruta de una planta de una especie Rosaceae durante, o después, del almacenamiento poscosecha, con respecto a la fruta de una planta de control bajo las mismas condiciones, comprendiendo el método reducir la expresión o actividad en la planta de un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una variante del polipéptido con al menos el 70 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de la longitud entera de SEQ ID NO: 1, en el que el método comprende la etapa de introducir un polinucleótido
30 en una célula de planta, o planta, para efectuar la reducción de la expresión del polipéptido o variante, en el que el polinucleótido comprende al menos uno de:

- 35 i) una secuencia con al menos el 70 % de identidad con parte de un gen endógeno, o ácido nucleico, que codifica el polipéptido o variante del mismo, y
ii) una secuencia que se hibrida bajo condiciones rigurosas con parte de un gen endógeno, o ácido nucleico, que codifica el polipéptido o variante del mismo,

en el que la variante tiene actividad de poligalacturonasa.

40 En una realización la fruta tiene al menos uno de:

- 45 a) pérdida de agua reducida,
b) separación de células reducida,
c) elevada jugosidad,
d) elevada capacidad de crujir,
e) elevada cerosidad, y
f) reducida susceptibilidad a patógenos necrofiticos, durante, o después, del almacenamiento poscosecha.

50 Preferentemente, además de elevada firmeza, la fruta también muestra al menos uno de a) a f). Preferentemente, además de elevada firmeza, la fruta tiene preferentemente al menos dos, más preferentemente al menos tres, más preferentemente al menos cuatro, más preferentemente al menos cinco, y lo más preferentemente todos, de a) a f).

En otra realización, la variante comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2.

55 En otra realización, la variante comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3.

Reducción de la expresión del polipéptido introduciendo un polinucleótido

60 En otra realización, el método comprende la etapa de introducir un polinucleótido en una célula de planta, o planta, para efectuar la reducción de la expresión del polipéptido o variante.

Direccionamiento de polipéptido que codifica gen usando polinucleótido complementario

65 En otra realización, el polinucleótido comprende una secuencia con al menos el 70 % de identidad con parte de un gen endógeno, o ácido nucleico, que codifica el polipéptido o variante del mismo.

- En otra realización, el polinucleótido comprende una secuencia que se hibrida bajo condiciones rigurosas con parte de un gen endógeno, o ácido nucleico, que codifica el polipéptido, o una variante del polipéptido.
- 5 La parte del gen endógeno puede incluir parte de un elemento seleccionado de un promotor, una secuencia no traducida 5' (UTR), un exón, un intrón, a 3' UTR o el terminador del gen, o puede englobar más de uno de tales elementos.
- En otra realización, el gen endógeno tiene al menos el 70 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 4.
- 10 En otra realización, el gen endógeno tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4.
- En otra realización, el ácido nucleico endógeno comprende una secuencia con al menos el 70 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 5.
- 15 En otra realización, el ácido nucleico endógeno comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.
- En otra realización, el ácido nucleico endógeno comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6.
- En otra realización, el ácido nucleico endógeno comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7.
- 20 En otra realización, el polinucleótido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que son al menos el 70 % idénticos a parte del gen endógeno o ácido nucleico.
- En otra realización, el polinucleótido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se hibridan bajo condiciones rigurosas con el gen endógeno o ácido nucleico.
- 25 En otra realización, el polinucleótido se introduce en la planta como parte de una construcción genética.
- En otra realización, la construcción genética es una construcción de expresión que comprende un promotor operativamente ligado al polinucleótido.
- 30 En otra realización, el polinucleótido está en una orientación sentido con respecto a un promotor.
- En otra realización, el polinucleótido está en una orientación antisentido con respecto a un promotor.
- 35 En otra realización, la construcción de expresión es una construcción de iARN.
- En otra realización, el polinucleótido y una secuencia complementaria al polinucleótido están incluidos en la construcción de iARN para formar el bucle de horquilla de la construcción de iARN.
- 40 En otra realización, el polinucleótido y una secuencia complementaria al polinucleótido están incluidos en la construcción de iARN para formar un ARN bicatenario cuando el polinucleótido y la secuencia complementaria al mismo se transcriben.
- 45 En otra realización, el polinucleótido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia con al menos el 70 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 4.
- En otra realización, el polinucleótido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 4.
- 50 En otra realización, el polinucleótido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia con al menos el 70 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 5.
- En otra realización, el polinucleótido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 5.
- 55 En otra realización, el polinucleótido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 6.
- En otra realización, el polinucleótido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 7.
- 60 En otra realización, una planta con expresión reducida del polipéptido se regenera a partir de la célula de planta.
- 65 También se describe en el presente documento una planta producida por el método.

Construcciones de silenciamiento y células y plantas que contienen las construcciones de silenciamiento

5 También se describe en el presente documento una construcción de expresión que comprende un promotor operativamente ligado a un polinucleótido que comprende un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia con al menos el 70 % de identidad con una cualquiera de SEQ ID NO: 4, 5, 6 y 7, en la que la secuencia con el 70 % de identidad con una cualquiera de SEQ ID NO: 4, 5, 6 y 7 codifica un polipéptido con actividad de poligalacturonasa.

10 En una realización, el polinucleótido comprende un fragmento de al menos 15 nucleótidos contiguos de una cualquiera de SEQ ID NO: 4, 5, 6 y 7.

En otra realización, el polinucleótido está en una orientación antisentido con respecto a un promotor.

15 En otra realización, la construcción de expresión es una construcción de iARN.

En otra realización, el polinucleótido y una secuencia complementaria al polinucleótido están incluidos en la construcción de iARN para formar el bucle de horquilla de la construcción de iARN.

20 En otra realización, el polinucleótido y una secuencia complementaria al polinucleótido están incluidos en la construcción de iARN para formar un ARN bicatenario cuando el polinucleótido y la secuencia complementaria al mismo se transcriben.

25 También se describe en el presente documento una célula de planta, o planta, que comprende una construcción de expresión de la invención.

Preferentemente, la célula de planta de la planta tiene expresión modificada del ácido nucleico endógeno correspondiente al polinucleótido.

30 Preferentemente, el ácido nucleico endógeno codifica un polipéptido con actividad de poligalacturonasa.

En una realización adicional, la planta tiene, o es capaz de producir, fruta con elevada vida de almacenamiento poscosecha.

35 Además de la elevada firmeza la fruta puede tener al menos uno de:

- a) pérdida de agua reducida,
- b) separación de células reducida,
- c) elevada jugosidad,
- d) elevada capacidad de crujir,
- 40 e) elevada cerosidad, y
- f) reducida susceptibilidad a patógenos necrofíticos, durante, o después, almacenamiento poscosecha.

45 Además de la elevada firmeza, la fruta puede tener al menos dos, más preferentemente al menos tres, más preferentemente al menos cuatro, más preferentemente al menos cinco, y lo más preferentemente todos, de b) a g).

50 También se describe en el presente documento un método de selección de una planta con, o capaz de producir, fruta que tiene elevada vida de almacenamiento poscosecha, comprendiendo el método probar una planta para expresión alterada de un polinucleótido que codifica un polipéptido con al menos el 70 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 1.

También se describe en el presente documento un método de selección de una planta con, o capaz de producir, fruta que tiene elevada vida de almacenamiento poscosecha, comprendiendo el método probar una planta para expresión alterada de un polipéptido con al menos el 70 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 1.

55 En una realización de los dos casos anteriores, el polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2.

En otra realización de los dos casos anteriores, el polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3.

60 También se describe en el presente documento un grupo o población de plantas seleccionadas por el método de la invención.

También se describe en el presente documento un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2 o 3 o una variante de la misma, en el que la variante tiene actividad de poligalacturonasa.

65 En una realización, la variante comprende una secuencia con al menos el 90 % de identidad con SEQ ID NO: 2:

En otra realización, el polipéptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2.

En una realización la variante comprende una secuencia con al menos el 90 % de identidad con SEQ ID NO: 3:

5 En otra realización, el polipéptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3.

También se describe en el presente documento un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6 o 7, o una variante de la misma, en el que la variante codifica un polipéptido con actividad de poligalacturonasa.

10 En una realización, la variante comprende una secuencia con al menos el 70 % de identidad de secuencias con la secuencia de SEQ ID NO: 6.

15 En una realización, el polinucleótido comprende la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 6.

En una realización, la variante comprende una secuencia con al menos el 70 % de identidad de secuencias con la secuencia de SEQ ID NO: 7.

20 En una realización, el polinucleótido comprende la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7.

También se describe en el presente documento una construcción genética que comprende un polinucleótido usado en la invención.

25 También se describe en el presente documento una construcción de expresión que comprende un polinucleótido usado en la invención.

También se describe en el presente documento una construcción de iARN que comprende un polinucleótido usado en la invención.

30 También se describe en el presente documento un vector que comprende una construcción de expresión, construcción genética o construcción de iARN usada en la invención.

También se describe en el presente documento una célula huésped genéticamente modificada para expresar un polinucleótido usado en la invención.

35 También se describe en el presente documento una célula huésped que comprende una construcción de expresión o construcción genética usada en la invención.

40 Preferentemente, la célula huésped es una célula de planta. Preferentemente, la célula de planta es parte de una planta.

También se describe en el presente documento una célula de planta genéticamente modificada para expresar un polinucleótido usado en la invención.

45 También se describe en el presente documento una célula de planta que comprende una construcción de expresión usada en la invención o la construcción genética usada en la invención.

50 Los polinucleótidos y variantes de polinucleótidos usados en los métodos de la invención pueden derivarse de cualquier especie. Los polinucleótidos y variantes también pueden producirse recombinantemente y también pueden ser los productos de enfoques de "barajado de genes".

En una realización, el polinucleótido o variante se deriva de una especie de planta.

55 En otra realización, el polinucleótido o variante se deriva de una especie de planta gimnosperma.

En otra realización, el polinucleótido o variante se deriva de una especie de planta angiosperma.

En otra realización, el polinucleótido o variante se deriva de una especie de planta dicotiledónea.

60 Las células vegetales y plantas descritas en el presente documento, que incluyen aquellas de las que se derivan los polinucleótidos, polinucleótidos de variante, polipéptido y polipéptidos de variante, pueden ser de cualquier especie de fruta.

65 En una realización la fruta es de la especie Rosaceae.

Géneros de Rosaceae preferidos incluyen *Exochorda*, *Maddenia*, *Oemleria*, *Osmaronia*, *Prinsepia*, *Prunus*, *Maloideae*, *Amelanchier*, *Aria*, *Aronia*, *Chaenomeles*, *Chamaemespilus*, *Cormus*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Osmaronia*, *Prinsepia*, *Prunus*, *Maloideae*, *Amelanchier*, *Aria*, *Aronia*, *Chaenomeles*, *Chamaemespilus*, *Cormus*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Dichotomanthes*, *Docynia*, *Docyniopsis*, *Eriobotrya*, *Eriolobus*, *Heteromeles*, *Kageneckia*, *Lindleya*, *Malacomeles*, *Malus*, *Mespilus*, *Osteomeles*, *Peraphyllum*, *Photinia*, *Pseudocydonia*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Rhaphiolepis*, *Sorbus*, *Stranvaesia*, *Torminalis*, *Vauquelinia*, *Rosoideae*, *Acaena*, *Acomastylis*, *Agrimonia*, *Alchemilla*, *Aphanes*, *Aremonia*, *Bencomia*, *Chamaebatia*, *Cliffortia*, *Coluria*, *Cowania*, *Dalibarda*, *Dendriopoterium*, *Dryas*, *Duchesnea*, *Erythrocoma*, *Fallugia*, *Filipendula*, *Fragaria*, *Geum*, *Hagenia*, *Horkelia*, *Ivesia*, *Kerria*, *Leucosidea*, *Marcetella*, *Margyricarpus*, *Novosieversia*, *Oncostylus*, *Polylepis*, *Potentilla*, *Rosa*, *Rubus*, *Sanguisorba*, *Sarcopoterium*, *Sibbaldia*, *Sieversia*, *Taihangia*, *Tetraglochin*, *Waldsteinia*, *Rosaceae incertae sedis*, *Adenostoma*, *Aruncus*, *Cercocarpus*, *Chamaebatiarica*, *Chamaerhodos*, *Gillenia*, *Holodiscus*, *Lyonothamnus*, *Neillia*, *Neviusia*, *Physocarpus*, *Purshia*, *Rhodotypos*, *Sorbaria*, *Spiraea* y *Stephanandra*.

Especies de Rosaceae preferidas incluyen: *Exochorda giraldii*, *Exochorda racemosa*, *Exochorda*, *Exochorda giraldii*, *Exochorda racemosa*, *Exochorda serratifolia*, *Maddenia hypoleuca*, *Oemleria cerasiformis*, *Osmaronia cerasiformis*, *Prinsepia sinensis*, *Prinsepia uniflora*, *Prunus alleghaniensis*, *Prunus americana*, *Prunus andersonii*, *Prunus angustifolia*, *Prunus apetala*, *Prunus argentea*, *Prunus armeniaca*, *Prunus avium*, *Prunus bifrons*, *Prunus brigantina*, *Prunus bucharica*, *Prunus buergeriana*, *Prunus campanulata*, *Prunus caroliniana*, *Prunus cerasifera*, *Prunus cerasus*, *Prunus choreiana*, *Prunus cocomilia*, *Prunus cyclamina*, *Prunus davidiana*, *Prunus debilis*, *Prunus domestica*, *Prunus dulcis*, *Prunus emarginata*, *Prunus fasciculata*, *Prunus ferganensis*, *Prunus fordiana*, *Prunus fremontii*, *Prunus fruticosa*, *Prunus geniculata*, *Prunus glandulosa*, *Prunus gracilis*, *Prunus grayana*, *Prunus hortulana*, *Prunus ilicifolia*, *Prunus incise*, *Prunus jacquemontii*, *Prunus japonica*, *Prunus kuramica*, *Prunus laurocerasus*, *Prunus leveilleana*, *Prunus lusitanica*, *Prunus maackii*, *Prunus mahaleb*, *Prunus mandshurica*, *Prunus maritima*, *Prunus maximowiczii*, *Prunus mexicana*, *Prunus microcarpa*, *Prunus mira*, *Prunus mume*, *Prunus munsoniana*, *Prunus nigra*, *Prunus nipponica*, *Prunus padus*, *Prunus pensylvanica*, *Prunus persia*, *Prunus petunnikowii*, *Prunus prostrata*, *Prunus pseudocerasus*, *Prunus pumila*, *Prunus rivularis*, *Prunus salicina*, *Prunus sargentii*, *Prunus sellowii*, *Prunus serotina*, *Prunus serrulata*, *Prunus sibirica*, *Prunus simonii*, *Prunus spinosa*, *Prunus spinulosa*, *Prunus subcordata*, *Prunus subhirtella*, *Prunus takesimensis*, *Prunus tenella*, *Prunus texana*, *Prunus tomentosa*, *Prunus tschonoskii*, *Prunus umbellata*, *Prunus verecunda*, *Prunus virginiana*, *Prunus webbii*, *Prunus x yedoensis*, *Prunus zippeliana*, *Prunus sp. BSP-2004-1*, *Prunus sp. BSP-2004-2*, *Prunus sp. EB-2002*, *Amelanchier alnifolia*, *Amelanchier arborea*, *Amelanchier asiatica*, *Amelanchier bartramiana*, *Amelanchier canadensis*, *Amelanchier cusickii*, *Amelanchier fernaldii*, *Amelanchier florida*, *Amelanchier humilis*, *Amelanchier intermedia*, *Amelanchier laevis*, *Amelanchier lucida*, *Amelanchier nantucketensis*, *Amelanchier pumila*, *Amelanchier quinti-martii*, *Amelanchier sanguinea*, *Amelanchier stolonifera*, *Amelanchier utahensis*, *Amelanchier wiegandii*, *Amelanchier x neglecta*, *Amelanchier bartramiana x Amelanchier sp. 'dentata'*, *Amelanchier sp. 'dentata'*, *Amelanchier sp. 'erecta'*, *Amelanchier sp. 'erecta' x Amelanchier laevis*, *Amelanchier sp. 'serotina'*, *Aria alnifolia*, *Aronia prunifolia*, *Chaenomeles cathayensis*, *Chaenomeles speciosa*, *Chamaemespilus alpina*, *Cormus domestica*, *Cotoneaster apiculatus*, *Cotoneaster lacteus*, *Cotoneaster pannosus*, *Crataegus azarolus*, *Crataegus columbiana*, *Crataegus crus-galli*, *Crataegus curvisepala*, *Crataegus laevigata*, *Crataegus mollis*, *Crataegus monogyna*, *Crataegus nigra*, *Crataegus rivularis*, *Crataegus sinaica*, *Cydonia oblonga*, *Dichotomanthes tristanicarpa*, *Docynia delavayi*, *Docyniopsis tschonoskii*, *Eriobotrya japonica*, *Eriobotrya prinoides*, *Eriolobus trilobatus*, *Heteromeles arbutifolia*, *Kageneckia angustifolia*, *Kageneckia oblonga*, *Lindleya mespiloides*, *Malacomeles denticulata*, *Malus angustifolia*, *Malus asiatica*, *Malus baccata*, *Malus coronaria*, *Malus doumeri*, *Malus florentina*, *Malus floribunda*, *Malus fusca*, *Malus halliana*, *Malus honanensis*, *Malus hupehensis*, *Malus ioensis*, *Malus kansuensis*, *Malus mandshurica*, *Malus micromalus*, *Malus niedzwetzkyana*, *Malus ombrophilia*, *Malus orientalis*, *Malus prattii*, *Malus prunifolia*, *Malus pumila*, *Malus sargentii*, *Malus sieboldii*, *Malus sieversii*, *Malus sylvestris*, *Malus toringoides*, *Malus transitoria*, *Malus trilobata*, *Malus tschonoskii*, *Malus x domestica*, *Malus x domestica x Malus sieversii*, *Malus x domestica x Pyrus communis*, *Malus xiaojinensis*, *Malus yunnanensis*, *Malus sp.*, *Mespilus germanica*, *Osteomeles anthyllidifolia*, *Osteomeles schwerinae*, *Peraphyllum ramosissimum*, *Photinia fraseri*, *Photinia pyrifolia*, *Photinia serrulata*, *Photinia villosa*, *Pseudocydonia sinensis*, *Pyracantha coccinea*, *Pyracantha fortuneana*, *Pyrus calleryana*, *Pyrus caucasica*, *Pyrus communis*, *Pyrus elaeagrifolia*, *Pyrus hybrid cultivar*, *Pyrus pyrifolia*, *Pyrus salicifolia*, *Pyrus ussuriensis*, *Pyrus x bretschneideri*, *Rhaphiolepis indica*, *Sorbus americana*, *Sorbus aria*, *Sorbus aucuparia*, *Sorbus californica*, *Sorbus commixta*, *Sorbus hupehensis*, *Sorbus scopulina*, *Sorbus sibirica*, *Sorbus torminalis*, *Stranvaesia davidiana*, *Torminalis clusii*, *Vauquelinia californica*, *Vauquelinia corymbosa*, *Acaena anserinifolia*, *Acaena argentea*, *Acaena caesiiglauca*, *Acaena cylindristachya*, *Acaena digitata*, *Acaena echinata*, *Acaena elongata*, *Acaena eupatoria*, *Acaena fissistipula*, *Acaena inermis*, *Acaena laevigata*, *Acaena latebrosa*, *Acaena lucida*, *Acaena macrocephala*, *Acaena magellanica*, *Acaena masafuerana*, *Acaena montana*, *Acaena multifida*, *Acaena novaezelandiae*, *Acaena ovalifolia*, *Acaena pinnatifida*, *Acaena splendens*, *Acaena subincisa*, *Acaena x anserovina*, *Acomastylis elata*, *Acomastylis rossii*, *Acomastylis sikkimensis*, *Agrimonia eupatoria*, *Agrimonia nipponica*, *Agrimonia parviflora*, *Agrimonia pilosa*, *Alchemilla alpina*, *Alchemilla erythropoda*, *Alchemilla japonica*, *Alchemilla mollis*, *Alchemilla vulgaris*, *Aphanes arvensis*, *Aremonia agrimonioides*, *Bencomia brachystachya*, *Bencomia caudata*, *Bencomia exstipulata*, *Bencomia sphaerocarpa*, *Chamaebatia foliolosa*, *Cliffortia burmeana*, *Cliffortia caneata*, *Cliffortia dentata*, *Cliffortia graminea*, *Cliffortia heterophylla*, *Cliffortia nitidula*, *Cliffortia odorata*, *Cliffortia ruscifolia*, *Cliffortia sericea*, *Coluria elegans*, *Coluria geoides*, *Cowania stansburiana*, *Dalibarda repens*, *Dendriopoterium menendezii*, *Dendriopoterium pulidoi*, *Dryas drummondii*, *Dryas octopetala*, *Duchesnea chrysantha*, *Duchesnea indica*, *Erythrocoma triflora*, *Fallugia paradoxa*, *Filipendula multijuga*, *Filipendula purpurea*, *Filipendula ulmaria*, *Filipendula vulgaris*, *Fragaria chiloensis*, *Fragaria daltoniana*, *Fragaria gracilis*, *Fragaria*

grandiflora, *Fragaria iinumae*, *Fragaria moschata*, *Fragaria nilgerrensis*, *Fragaria nipponica*, *Fragaria nubicola*,
Fragaria orientalis, *Fragaria pentaphylla*, *Fragaria vesca*, *Fragaria virginiana*, *Fragaria viridis*, *Fragaria x ananassa*,
Fragaria sp. CFRA 538, *Fragaria sp.*, *Geum andicola*, *Geum borisi*, *Geum bulgaricum*, *Geum calthifolium*, *Geum*
5 *chiloense*, *Geum geniculatum*, *Geum heterocarpum*, *Geum macrophyllum*, *Geum montanum*, *Geum reptans*, *Geum*
rivale, *Geum schofieldii*, *Geum speciosum*, *Geum urbanum*, *Geum vernum*, *Geum sp. 'Chase 2507 K'*, *Hagenia*
abyssinica, *Horkelia cuneata*, *Horkelia fusca*, *Ivesia gordonii*, *Kerria japonica*, *Leucosidea sericea*, *Marcetella*
maderensis, *Marcetella moquiniana*, *Margyricarpus pinnatus*, *Margyricarpus setosus*, *Novosieversia glacialis*,
10 *Oncostylus cockaynei*, *Oncostylus leiiospermus*, *Polylepis australis*, *Polylepis besseri*, *Polylepis crista-galli*, *Polylepis*
hieronymi, *Polylepis incana*, *Polylepis lanuginosa*, *Polylepis multijuga*, *Polylepis neglecta*, *Polylepis pauta*, *Polylepis*
pepei, *Polylepis quadrijuga*, *Polylepis racemosa*, *Polylepis reticulata*, *Polylepis rugulosa*, *Polylepis sericea*, *Polylepis*
subsericans, *Polylepis tarapacana*, *Polylepis tomentella*, *Polylepis weberbaueri*, *Potentilla anserina*, *Potentilla arguta*,
15 *Potentilla bifurca*, *Potentilla chinensis*, *Potentilla dickinsii*, *Potentilla erecta*, *Potentilla fragarioides*, *Potentilla fruticosa*,
Potentilla indica, *Potentilla micrantha*, *Potentilla multifida*, *Potentilla nivea*, *Potentilla norvegica*, *Potentilla palustris*,
Potentilla peduncularis, *Potentilla reptans*, *Potentilla salesoviana*, *Potentilla stenophylla*, *Potentilla tridentata*, *Rosa*
abietina, *Rosa abyssinica*, *Rosa acicularis*, *Rosa agrestis*, *Rosa alba*, *Rosa alba x Rosa corymbifera*, *Rosa altaica*,
20 *Rosa arkansana*, *Rosa arvensis*, *Rosa banksiae*, *Rosa beggeriana*, *Rosa blanda*, *Rosa bracteata*, *Rosa brunonii*,
Rosa caesia, *Rosa californica*, *Rosa canina*, *Rosa carolina*, *Rosa chinensis*, *Rosa cinnamomea*, *Rosa columnifera*,
Rosa corymbifera, *Rosa cymosa*, *Rosa davurica*, *Rosa dumalis*, *Rosa ecae*, *Rosa eglanteria*, *Rosa elliptica*, *Rosa*
fedtschenkoana, *Rosa foetida*, *Rosa foliolosa*, *Rosa gallica*, *Rosa gallica x Rosa dumetorum*, *Rosa gigantea*, *Rosa*
glauca, *Rosa helenae*, *Rosa henryi*, *Rosa hugonis*, *Rosa hybrid cultivar*, *Rosa inodora*, *Rosa jundzillii*, *Rosa*
laevigata, *Rosa laxa*, *Rosa luciae*, *Rosa majalis*, *Rosa marretii*, *Rosa maximowicziana*, *Rosa micrantha*, *Rosa mollis*,
25 *Rosa montana*, *Rosa moschata*, *Rosa moyesii*, *Rosa multibracteata*, *Rosa multiflora*, *Rosa nitida*, *Rosa odorata*,
Rosa palustris, *Rosa pendulina*, *Rosa persica*, *Rosa phoenicia*, *Rosa platyacantha*, *Rosa primula*, *Rosa*
pseudoscabriuscula, *Rosa roxburghii*, *Rosa rubiginosa*, *Rosa rugosa*, *Rosa sambucina*, *Rosa sempervirens*, *Rosa*
sericea, *Rosa sertata*, *Rosa setigera*, *Rosa sherardii*, *Rosa sicula*, *Rosa spinosissima*, *Rosa stellata*, *Rosa stylosa*,
Rosa subcanina, *Rosa subcollina*, *Rosa suffulta*, *Rosa tomentella*, *Rosa tomentosa*, *Rosa tunquinensis*, *Rosa villosa*,
30 *Rosa virginiana*, *Rosa wichurana*, *Rosa willmottiae*, *Rosa woodsii*; *Rosa x damascena*, *Rosa x fortuniana*, *Rosa x*
macrantha, *Rosa xanthina*, *Rosa sp.*, *Rubus alceifolius*, *Rubus allegheniensis*, *Rubus alpinus*, *Rubus amphidasys*,
Rubus arcticus, *Rubus argutus*, *Rubus assamensis*, *Rubus australis*, *Rubus bifrons*, *Rubus caesius*, *Rubus caesius x*
Rubus idaeus, *Rubus canadensis*, *Rubus canescens*, *Rubus caucasicus*, *Rubus chamaemorus*, *Rubus*
corchorifolius, *Rubus crataegifolius*, *Rubus cuneifolius*, *Rubus deliciosus*, *Rubus divaricatus*, *Rubus ellipticus*, *Rubus*
flagellaris, *Rubus fruticosus*, *Rubus geoides*, *Rubus glabratus*, *Rubus glaucus*, *Rubus gunnianus*, *Rubus hawaiiensis*,
Rubus hawaiiensis x Rubus rosifolius, *Rubus hispidus*, *Rubus hochstetterorum*, *Rubus humulifolius*, *Rubus idaeus*,
35 *Rubus lambertianus*, *Rubus lasiococcus*, *Rubus leucodermis*, *Rubus lineatus*, *Rubus macraei*, *Rubus maximiformis*,
Rubus minusculus, *Rubus moorei*, *Rubus multibracteatus*, *Rubus neomexicanus*, *Rubus nepalensis*, *Rubus*
nessensis, *Rubus nivalis*, *Rubus niveus*, *Rubus nubigenus*, *Rubus occidentalis*, *Rubus odoratus*, *Rubus palmatus*,
Rubus parviflorus, *Rubus parvifolius*, *Rubus parvus*, *Rubus pectinellus*, *Rubus pedatus*, *Rubus pedemontanus*,
Rubus pensilvanicus, *Rubus phoenicolasius*, *Rubus picticaulis*, *Rubus pubescens*, *Rubus rigidus*, *Rubus robustus*,
40 *Rubus roseus*, *Rubus rosifolius*, *Rubus sanctus*, *Rubus sapidus*, *Rubus saxatilis*, *Rubus setosus*, *Rubus spectabilis*,
Rubus sulcatus, *Rubus tephrodes*, *Rubus trianthus*, *Rubus tricolor*, *Rubus trifidus*, *Rubus trilobus*, *Rubus trivalis*,
Rubus ulmifolius, *Rubus ursinus*, *Rubus urticifolius*, *Rubus vigorosus*, *Rubus sp. JPM-2004*, *Sanguisorba albiflora*,
Sanguisorba alpina, *Sanguisorba ancistroides*, *Sanguisorba annua*, *Sanguisorba canadensis*, *Sanguisorba filiformis*,
Sanguisorba hakusanensis, *Sanguisorba japonensis*, *Sanguisorba minor*, *Sanguisorba obtusa*, *Sanguisorba*
officinalis, *Sanguisorba parviflora*, *Sanguisorba stipulata*, *Sanguisorba tenuifolia*, *Sarcopoterium spinosum*, *Sibbaldia*
45 *procumbens*, *Sieversia pentapetala*, *Sieversia pusilla*, *Taihangia rupestris*, *Tetraglochin cristatum*, *Waldsteinia*
fragarioides, *Waldsteinia geoides*, *Adenostoma fasciculatum*, *Adenostoma sparsifolium*, *Aruncus dioicus*,
Cercocarpus betuloides, *Cercocarpus ledifolius*, *Chamaebatiaria millefolium*, *Chamaerhodos erecta*, *Gillenia*
stipulata, *Gillenia trifoliata*, *Holodiscus discolor*, *Holodiscus microphyllus*, *Lyonothamnus floribundus*, *Neillia affinis*,
Neillia gracilis, *Neillia sinensis*, *Neillia sparsiflora*, *Neillia thibetica*, *Neillia thyriflora*, *Neillia uekii*, *Neviusia*
50 *alabamensis*, *Physocarpus alternans*, *Physocarpus amurensis*, *Physocarpus capitatus*, *Physocarpus malvaceus*,
Physocarpus monogynus, *Physocarpus opulifolius*, *Purshia tridentata*, *Rhodotypos scandens*, *Sorbaria arborea*,
Sorbaria sorbifolia, *Spiraea betulifolia*, *Spiraea cantoniensis*, *Spiraea densiflora*, *Spiraea japonica*, *Spiraea nipponica*,
Spiraea x vanhouttei, *Spiraea sp.*, *Stephanandra chinensis*, *Stephanandra incisa* y *Stephanandra tanakae*.

55 Un género particularmente preferido es *Malus*.

Especies de *Malus* preferidas incluyen: *Malus aldenhamii* *Malus angustifolia*, *Malus asiatica*, *Malus baccata*, *Malus*
coronaria, *Malus domestica*, *Malus doumeri*, *Malus florentina*, *Malus floribunda*, *Malus fusca*, *Malus halliana*, *Malus*
60 *honanensis*, *Malus hupehensis*, *Malus ioensis*, *Malus kansuensis*, *Malus mandshurica*, *Malus micromalus*, *Malus*
niedzwetzkyana, *Malus ombrophilia*, *Malus orientalis*, *Malus prattii*, *Malus prunifolia*, *Malus pumila*, *Malus sargentii*,
Malus sieboldii, *Malus sieversii*, *Malus sylvestris*, *Malus toringoides*, *Malus transitoria*, *Malus trilobata*, *Malus*
tschonoskii, *Malus x domestica*, *Malus x domestica x Malus sieversii*, *Malus sylvestris*, *Malus x domestica x Pyrus*
communis, *Malus xiaojinensis*, *Malus yunnanensis*, *Malus sp.*, *Mespilus germanica*,

65 Una especie de planta particularmente preferida es *Malus domestica*.

Métodos de la invención que incluyen producir plantas con elevada firmeza son particularmente adecuados para la especie *Malus* y fruta que no tiene una textura carne blanda cuando maduran tal como la pera asiática y melocotones de carne dura.

5 Descripción detallada

El término “que comprende”, como se usa en esta memoria descriptiva, significa “que consiste al menos en parte de”. Cuando se interpreta cada afirmación en esta memoria descriptiva que incluye el término “que comprende”, características distintas de aquella o aquellas introducidas por el término también pueden estar presentes. Términos relacionados tales como “comprenden” y “comprende” deben interpretarse del mismo modo.

La invención proporciona métodos y composición para producir plantas con fruta que tiene elevada vida de almacenamiento poscosecha como se define en la reivindicación 1. La fruta tiene elevada firmeza, y puede tener al menos una de las siguientes características:

- a) pérdida de agua reducida,
- b) separación de células reducida,
- c) elevada jugosidad,
- d) elevada capacidad de crujiar,
- e) elevada cerosidad, y
- f) reducida susceptibilidad a patógenos necrofíticos.

La elevada firmeza y los términos, a) a f), pretenden ser términos relativos. Es decir, relativo a la fruta de plantas de control bajo las mismas condiciones.

Por ejemplo, una fruta con “elevada firmeza” es más firme que una fruta de control (o fruta de una planta de control) sometida a las mismas condiciones durante, o después, del almacenamiento poscosecha. Así “elevada firmeza” de la fruta del método de la invención es equivalente a “blandura reducida” de la fruta del método de la invención, cuando la planta de control se ablanda más durante o después del almacenamiento poscosecha que la fruta del método de la invención. No se pretende que “elevada firmeza” durante, o después, del almacenamiento poscosecha signifique que una fruta se vuelve más firme de lo que era antes del almacenamiento poscosecha.

Similarmente, cada uno de los otros términos a) a f) anteriores son con respecto a fruta de control bajo las mismas condiciones.

El término “almacenamiento poscosecha” se refiere al almacenamiento de la fruta después de cosecharse de la planta/árbol.

Condiciones de almacenamiento poscosecha típicas pueden incluir almacenamiento en atmósfera controlada, y/o modificación de la temperatura (normalmente 0,5 °C a 3 °C) y/o aplicación de reguladores del crecimiento (tales como 1-MCP).

Las condiciones de almacenamiento poscosecha preferidas dependen de la región de crecimiento y cuánto tiempo se tiene previsto que necesita almacenarse la fruta.

Condiciones de almacenamiento poscosecha a modo de ejemplo con el fin de la invención son 0,5 °C durante 10 semanas

Polinucleótido y fragmentos

El término “polinucleótido(s)”, como se usa en el presente documento, significa un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido mono o bicatenario de cualquier longitud, pero preferentemente al menos 15 nucleótidos, e incluyen como ejemplos no limitantes secuencias codificantes y no codificantes de un gen, secuencias sentido y antisentido, complementos, exones, intrones, ADN genómico, ADNc, pre-ARNm, ARNm, ARNr, ARNip, miARN, ARNt, ribozimas, polipéptidos recombinantes, secuencias de ADN o ARN que existen de forma natural aisladas y purificadas, secuencias de ARN y de ADN sintéticas, sondas de ácido nucleico, cebadores y fragmentos.

Un “fragmento” de una secuencia de polinucleótidos proporcionada en el presente documento es una subsecuencia de nucleótidos contiguos que es capaz de hibridación específica con una diana de interés, por ejemplo, una secuencia que tiene al menos 15 nucleótidos en longitud. Los fragmentos pueden comprender 15 nucleótidos, preferentemente al menos 16 nucleótidos, más preferentemente al menos 17 nucleótidos, más preferentemente al menos 18 nucleótidos, más preferentemente al menos 19 nucleótidos, más preferentemente al menos 20 nucleótidos, más preferentemente al menos 21 nucleótidos, más preferentemente al menos 22 nucleótidos, más preferentemente al menos 23 nucleótidos, más preferentemente al menos 24 nucleótidos, más preferentemente al menos 25 nucleótidos, más preferentemente al menos 26 nucleótidos, más preferentemente al menos 27 nucleótidos, más preferentemente al menos 28 nucleótidos, más preferentemente al menos 29 nucleótidos, más

preferentemente al menos 30 nucleótidos, más preferentemente al menos 31 nucleótidos, más preferentemente al menos 32 nucleótidos, más preferentemente al menos 33 nucleótidos, más preferentemente al menos 34 nucleótidos, más preferentemente al menos 35 nucleótidos, más preferentemente al menos 36 nucleótidos, más preferentemente al menos 37 nucleótidos, más preferentemente al menos 38 nucleótidos, más preferentemente al menos 39 nucleótidos, más preferentemente al menos 40 nucleótidos, más preferentemente al menos 41 nucleótidos, más preferentemente al menos 42 nucleótidos, más preferentemente al menos 43 nucleótidos, más preferentemente al menos 44 nucleótidos, más preferentemente al menos 45 nucleótidos, más preferentemente al menos 46 nucleótidos, más preferentemente al menos 47 nucleótidos, más preferentemente al menos 48 nucleótidos, más preferentemente al menos 49 nucleótidos, más preferentemente al menos 50 nucleótidos, más preferentemente al menos 51 nucleótidos, más preferentemente al menos 52 nucleótidos, más preferentemente al menos 53 nucleótidos, más preferentemente al menos 54 nucleótidos, más preferentemente al menos 55 nucleótidos, más preferentemente al menos 56 nucleótidos, más preferentemente al menos 57 nucleótidos, más preferentemente al menos 58 nucleótidos, más preferentemente al menos 59 nucleótidos, más preferentemente al menos 60 nucleótidos, más preferentemente al menos 61 nucleótidos, más preferentemente al menos 62 nucleótidos, más preferentemente al menos 63 nucleótidos, más preferentemente al menos 64 nucleótidos, más preferentemente al menos 65 nucleótidos, más preferentemente al menos 66 nucleótidos, más preferentemente al menos 67 nucleótidos, más preferentemente al menos 68 nucleótidos, más preferentemente al menos 69 nucleótidos, más preferentemente al menos 70 nucleótidos, más preferentemente al menos 71 nucleótidos, más preferentemente al menos 72 nucleótidos, más preferentemente al menos 73 nucleótidos, más preferentemente al menos 74 nucleótidos, más preferentemente al menos 75 nucleótidos, más preferentemente al menos 76 nucleótidos, más preferentemente al menos 77 nucleótidos, más preferentemente al menos 78 nucleótidos, más preferentemente al menos 79 nucleótidos, más preferentemente al menos 80 nucleótidos, más preferentemente al menos 81 nucleótidos, más preferentemente al menos 82 nucleótidos, más preferentemente al menos 83 nucleótidos, más preferentemente al menos 84 nucleótidos, más preferentemente al menos 85 nucleótidos, más preferentemente al menos 86 nucleótidos, más preferentemente al menos 87 nucleótidos, más preferentemente al menos 88 nucleótidos, más preferentemente al menos 89 nucleótidos, más preferentemente al menos 90 nucleótidos, más preferentemente al menos 91 nucleótidos, más preferentemente al menos 92 nucleótidos, más preferentemente al menos 93 nucleótidos, más preferentemente al menos 94 nucleótidos, más preferentemente al menos 95 nucleótidos, más preferentemente al menos 96 nucleótidos, más preferentemente al menos 97 nucleótidos, más preferentemente al menos 98 nucleótidos, más preferentemente al menos 99 nucleótidos, más preferentemente al menos 100 nucleótidos, más preferentemente al menos 150 nucleótidos, más preferentemente al menos 200 nucleótidos, más preferentemente al menos 250 nucleótidos, más preferentemente al menos 300 nucleótidos, más preferentemente al menos 350 nucleótidos, más preferentemente al menos 400 nucleótidos, más preferentemente al menos 450 nucleótidos y lo más preferentemente al menos 500 nucleótidos de nucleótidos contiguos de un polinucleótido desvelado. Un fragmento de una secuencia de polinucleótidos puede usarse en tecnología antisentido, de interferencia por ARN (iARN), silenciamiento génico, hélice triple o de ribozimas, o como un cebador, una sonda, incluido en una micromatriz, o usarse en métodos de selección basados en polinucleótidos de la invención.

El término "cebador" se refiere a un polinucleótido corto, normalmente que tiene un grupo 3'OH libre, que se hibrida con un molde y se usa para cebar la polimerización de un polinucleótido complementario a la diana.

El término "sonda" se refiere a un polinucleótido corto que se usa para detectar una secuencia de polinucleótidos, que es complementaria a la sonda, en un ensayo basado en hibridación. La sonda puede consistir en un "fragmento" de un polinucleótido como se define en el presente documento.

Polipéptidos y fragmentos

El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, engloba cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, pero preferentemente al menos 5 aminoácidos, que incluyen proteínas de longitud completa, en las que restos de aminoácidos están ligados por enlaces peptídicos covalentes. Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden ser productos naturales purificados, o pueden producirse parcialmente o completamente usando técnicas recombinantes o sintéticas.

El término puede referirse a un polipéptido, un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro multímero, un polipéptido de fusión, un fragmento de polipéptido, una variante de polipéptido, o derivado de los mismos.

Un "fragmento" de un polipéptido es una subsecuencia del polipéptido que realiza una función que se requiere para la actividad biológica y/o proporciona estructura tridimensional del polipéptido. El término puede referirse a un polipéptido, un agregado de un polipéptido tal como un dímero u otro multímero, un polipéptido de fusión, un fragmento de polipéptido, una variante de polipéptido, o derivado de los mismos, capaz de realizar la actividad enzimática anterior.

El término "aislado", como se aplica a las secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos desveladas en el presente documento, se usa para referirse a secuencias que se eliminan de su entorno celular natural. Una molécula aislada

puede obtenerse por cualquier método o combinación de métodos que incluyen técnicas bioquímicas, recombinantes y sintéticas.

5 El término "recombinante" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que se elimina de secuencias que la rodean en su contexto natural y/o se recombina con secuencias que no están presentes en su contexto natural.

Una secuencia de polipéptidos "recombinante" se produce por traducción de una secuencia de polinucleótidos "recombinante".

10 El término "derivado de" con respecto a los polinucleótidos o polipéptidos de la invención que se derivan de un género o especie particular significa que el polinucleótido o polipéptido tiene la misma secuencia que un polinucleótido o polipéptido encontrado naturalmente en ese género o especie. El polinucleótido o polipéptido, derivado de un género o especie particular, puede, por tanto, producirse sintéticamente o recombinantemente.

15 *Variantes*

Como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos diferentes de las secuencias específicamente identificadas, en el que uno o más nucleótidos o restos de aminoácidos está delecionado, sustituido, o añadido. Las variantes pueden ser variantes alélicas que existen de forma natural, o variantes que no existen de forma natural. Las variantes pueden ser de la misma o de otra especie y pueden englobar homólogos, parálogos y ortólogos. En ciertas realizaciones, las variantes de los polipéptidos y polipéptidos inventivos poseen actividades biológicas que son las mismas o similares a aquellas de los polipéptidos o polipéptidos inventivos. El término "variante", con referencia a polipéptidos y polipéptidos, engloba todas las formas de polipéptidos y polipéptidos, como se define en el presente documento.

25 *Variantes de polinucleótidos*

Las secuencias de polinucleótidos de variante presentan preferentemente al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 51 %, más preferentemente al menos el 52 %, más preferentemente al menos el 53 %, más preferentemente al menos el 54 %, más preferentemente al menos el 55 %, más preferentemente al menos el 56 %, más preferentemente al menos el 57 %, más preferentemente al menos el 58 %, más preferentemente al menos el 59 %, más preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 61 %, más preferentemente al menos el 62 %, más preferentemente al menos el 63 %, más preferentemente al menos el 64 %, más preferentemente al menos el 65 %, más preferentemente al menos el 66 %, más preferentemente al menos el 67 %, más preferentemente al menos el 68 %, más preferentemente al menos el 69 %, más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 71 %, más preferentemente al menos el 72 %, más preferentemente al menos el 73 %, más preferentemente al menos el 74 %, más preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 76 %, más preferentemente al menos el 77 %, más preferentemente al menos el 78 %, más preferentemente al menos el 79 %, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 81 %, más preferentemente al menos el 82 %, más preferentemente al menos el 83 %, más preferentemente al menos el 84 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 86 %, más preferentemente al menos el 87 %, más preferentemente al menos el 88 %, más preferentemente al menos el 89 %, más preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 91 %, más preferentemente al menos el 92 %, más preferentemente al menos el 93 %, más preferentemente al menos el 94 %, más preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 96 %, más preferentemente al menos el 97 %, más preferentemente al menos el 98 %, y lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con una secuencia descrita en el presente documento. La identidad se encuentra a lo largo de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, preferentemente al menos 50 posiciones de nucleótidos, más preferentemente al menos 100 posiciones de nucleótidos, y lo más preferentemente a lo largo de la longitud entera de polinucleótido descrita en el presente documento.

La identidad de secuencias de polinucleótidos puede determinarse del siguiente modo. La secuencia de polinucleótidos objeto se compara con una secuencia de polinucleótidos candidata usando BLASTN (del paquete de programas BLAST, versión 2.2.5 [Nov 2002]) en bl2seq (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250), que está públicamente disponible de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). Se utilizan los parámetros por defecto de bl2seq, excepto que debe apagarse el filtrado de partes de baja complejidad.

La identidad de secuencias de polinucleótidos puede examinarse usando los siguientes parámetros de la línea de comandos de Unix:

```
bl2seq -i nucleotideseq1 -j nucleotideseq2 -F F -p blastn
```

65 El parámetro -F F apaga el filtrado de secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. El programa bl2seq informa de la identidad de secuencias como tanto el número como el porcentaje de nucleótidos idénticos en una línea "Identidades =".

- También puede calcularse la identidad de secuencias de polinucleótidos a lo largo de la longitud entera del solapamiento entre un candidato y secuencias de polinucleótidos objeto usando programas de alineamiento de secuencias globales (por ejemplo, Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). Una implementación global del algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch se encuentra en el programa de Needle en el paquete EMBOSS (Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, *Trends in Genetics* June 2000, vol 16, No 6. pp. 276-277) que puede obtenerse de <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/>. El servidor del European Bioinformatics Institute también proporciona el servicio para realizar los alineamientos globales de EMBOSS-Needle entre dos secuencias en línea en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>.
- Alternativamente, puede usarse el programa GAP que calcula un alineamiento global óptimo de dos secuencias sin penalizar huecos terminales. GAP se describe en el siguiente documento: Huang, X. (1994) *On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences* 10, 227-235.
- Un método preferido para calcular el % de identidad de secuencias de polinucleótidos se basa en alinear secuencias que van a compararse usando Clustal X (Jeanmougin et al., 1998, *Trends Biochem. Sci.* 23, 403-5.)
- Variantes de polinucleótidos descritas en el presente documento también engloban aquellas que presentan una similitud con una o más de las secuencias específicamente identificadas que es probable que preserven la equivalencia funcional de aquellas secuencias y que no podría esperarse razonablemente que se hubieran producido por casualidad al azar. Tal similitud de secuencias con respecto a polipéptidos pueden determinarse usando el programa bl2seq públicamente disponible del paquete de programas BLAST (versión 2.2.5 [Nov 2002]) de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>).
- La similitud de secuencias de polinucleótidos puede examinarse usando los siguientes parámetros de la línea de comandos de Unix:
- ```
bl2seq -i nucleotideseq1 -j nucleotideseq2 -F F -p tblastx
```
- El parámetro -F F apaga el filtrado de secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencias. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias y para cada región tal informa un "valor de E" que es el número esperado de veces que podría esperarse ver una coincidencia tal por casualidad en una base de datos de un tamaño de referencia fijo que contiene secuencias al azar. El tamaño de esta base de datos está establecido por defecto en el programa bl2seq. Para valores de E pequeños, muy inferiores a uno, el valor de E es aproximadamente la probabilidad de una coincidencia al azar tal.
- Secuencias de polinucleótidos de variante presentan preferentemente un valor de E de inferior a  $1 \times 10^{-6}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-9}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-12}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-15}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-18}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-21}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-30}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-40}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-50}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-60}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-70}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-80}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-90}$  y lo más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-100}$  cuando se comparan con una cualquiera de las secuencias específicamente identificadas.
- Alternativamente, los polinucleótidos de variante usados en los métodos de la invención se hibridan con las secuencias de polinucleótidos especificadas, o complementos de las mismas, bajo condiciones rigurosas.
- El término "se hibridan bajo condiciones rigurosas", y equivalentes gramaticales del mismo, se refiere a la capacidad de una molécula de polinucleótido para hibridarse con una molécula de polinucleótido diana (tal como una molécula de polinucleótido diana inmovilizada sobre una transferencia de ADN o de ARN, tal como una transferencia Southern o transferencia Northern) bajo condiciones definidas de temperatura y concentración de sales. La capacidad para hibridarse bajo condiciones de hibridación rigurosas puede determinarse hibridando inicialmente bajo condiciones menos rigurosas, luego aumentando la rigurosidad a la rigurosidad deseada.
- Con respecto a moléculas de polinucleótidos de más de aproximadamente 100 bases de longitud, condiciones de hibridación rigurosas típicas son no superiores a 25 a 30 °C (por ejemplo, 10 °C) por debajo de la temperatura de fusión (Tm) del dúplex nativo (véase generalmente Sambrook et al., Eds, 1987, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press; Ausubel et al., 1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing.). Pueden calcularse Tm para las moléculas de polinucleótidos superiores a aproximadamente 100 bases por la fórmula  $T_m = 81,5 + 0,41 \% (G + C - \log (Na^+))$  (Sambrook et al., Eds, 1987, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press; Bolton and McCarthy, 1962, *PNAS* 84:1390). Condiciones rigurosas típicas para el polinucleótido de más de 100 bases de longitud serían condiciones de hibridación tales como prelavar en una disolución de 6X SSC, 0,2 % de SDS; hibridar a 65 °C, 6X SSC, 0,2 % de SDS durante la noche; seguido de dos lavados de 30 minutos cada uno en 1X SSC, 0,1 % de SDS a 65 °C y dos lavados de 30 minutos cada uno en 0,2X SSC, 0,1 % de SDS a 65 °C.

Con respecto a las moléculas de polinucleótidos que tienen una longitud inferior a 100 bases, condiciones de hibridación rigurosas a modo de ejemplo son 5 a 10 °C por debajo de T<sub>m</sub>. En promedio, la T<sub>m</sub> de una molécula de polinucleótido de longitud inferior a 100 pb se reduce aproximadamente (500/longitud de oligonucleótido) °C.

5 Con respecto a los miméticos de ADN conocidos como ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) (Nielsen et al., Science. 1991 Dec 6;254(5037):1497-500), los valores de T<sub>m</sub> son superiores a aquellos para híbridos de ADN-ADN o ADN-ARN, y pueden calcularse usando la fórmula descrita en Giesen et al., Nucleic Acids Res. 1998 Nov 1;26(21):5004-6. Condiciones de hibridación rigurosas a modo de ejemplo para un híbrido de ADN-PNA que tiene una longitud inferior a 100 bases son 5 a 10 °C por debajo de la T<sub>m</sub>.

10 Los polinucleótidos de variante usados en los métodos de la invención también engloban polinucleótidos que se diferencian de las secuencias de la invención pero que, como consecuencia de la degeneración del código genético, codifican un polipéptido que tiene actividad similar a un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Una alteración de secuencia que no cambia la secuencia de aminoácidos del polipéptido es una "variación silenciosa". Excepto por ATG (metionina) y TGG (triptófano), otros codones para el mismo aminoácido pueden cambiarse por técnicas reconocidas en la técnica, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones en un organismo huésped particular.

15 Las alteraciones de secuencias de polinucleótidos que producen sustituciones conservativas de uno o varios aminoácidos en la secuencia de polipéptidos codificada sin alterar significativamente su actividad biológica también están incluidas en la invención. Un experto conocerá métodos de preparación de sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas (véase, por ejemplo, Bowie et al., 1990, Science 247, 1306).

20 Los polinucleótidos de variante debidos a variaciones silenciosas y sustituciones conservativas en la secuencia de polipéptidos codificada pueden determinarse usando el programa bl2seq públicamente disponible del paquete de programas BLAST (versión 2.2.5 [Nov 2002]) de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>) mediante el algoritmo tblastx como se describe previamente.

25 La función de un polinucleótido o polipéptido de variante descrito en el presente documento como una poligalacturonasa puede evaluarse, por ejemplo, expresando una secuencia tal en levadura y probando la actividad de la proteína codificada como se describe previamente para proteínas relacionadas con la pared celular (van Rensberg et al 1994; Saladie et al 2006). La función de una variante también puede probarse para su capacidad para alterar la actividad de poligalacturonasa en plantas, como se describe en (Hellens et al 2005). La función de variantes en alterar la vida de almacenamiento poscosecha puede probarse por métodos descritos en esta memoria descriptiva (por ejemplo, en la sección de ejemplos) y por otros métodos conocidos para aquellos expertos en la materia.

#### *Variantes de polipéptido*

40 El término "variante" con referencia a polipéptidos engloba polipéptidos que existen de forma natural, recombinantemente y sintéticamente producidos. Las secuencias de polipéptidos de variante presentan preferentemente al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 51 %, más preferentemente al menos el 52 %, más preferentemente al menos el 53 %, más preferentemente al menos el 54 %, más preferentemente al menos el 55 %, más preferentemente al menos el 56 %, más preferentemente al menos el 57 %, más preferentemente al menos el 58 %, más preferentemente al menos el 59 %, más preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 61 %, más preferentemente al menos el 62 %, más preferentemente al menos el 63 %, más preferentemente al menos el 64 %, más preferentemente al menos el 65 %, más preferentemente al menos el 66 %, más preferentemente al menos el 67 %, más preferentemente al menos el 68 %, más preferentemente al menos el 69 %, más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 71 %, más preferentemente al menos el 72 %, más preferentemente al menos el 73 %, más preferentemente al menos el 74 %, más preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 76 %, más preferentemente al menos el 77 %, más preferentemente al menos el 78 %, más preferentemente al menos el 79 %, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 81 %, más preferentemente al menos el 82 %, más preferentemente al menos el 83 %, más preferentemente al menos el 84 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 86 %, más preferentemente al menos el 87 %, más preferentemente al menos el 88 %, más preferentemente al menos el 89 %, más preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 91 %, más preferentemente al menos el 92 %, más preferentemente al menos el 93 %, más preferentemente al menos el 94 %, más preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 96 %, más preferentemente al menos el 97 %, más preferentemente al menos el 98 %, y lo más preferentemente al menos el 99 % de identidad con las secuencias descritas en el presente documento. La identidad se encuentra a lo largo de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de aminoácidos, preferentemente al menos 50 posiciones de aminoácidos, más preferentemente al menos 100 posiciones de aminoácidos, y lo más preferentemente a lo largo de la longitud entera de un polipéptido descrito en el presente documento.

65 La identidad de secuencias de polipéptidos puede determinarse del siguiente modo. La secuencia de polipéptidos objeto se compara con una secuencia de polipéptidos candidata usando BLASTP (del paquete de programas

BLAST, versión 2.2.5 [Nov 2002]) en bl2seq, que está públicamente disponible de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). Se utilizan los parámetros por defecto de bl2seq, excepto que debe apagarse el filtrado de regiones de baja complejidad.

5 También puede calcularse la identidad de secuencias de polipéptidos a lo largo de la longitud entera del solapamiento entre un candidato y secuencias de polinucleótidos objeto usando programas de alineamiento de secuencias globales. EMBOSS-Needle (disponible en <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) y GAP (Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235) como se tratan anteriormente también son programas de alineamiento de secuencias globales adecuados para calcular la identidad de secuencias de polipéptidos.

Un método preferido para calcular el % de identidad de secuencias de polipéptidos se basa en alinear secuencias que van a compararse usando Clustal X (Jeanmougin et al., 1998, Trends Biochem. Sci. 23, 403-5.)

15 Variantes de polipéptidos descritas en el presente documento también engloban aquellas que presentan una similitud con una o más de las secuencias específicamente identificadas que es probable que preserven la equivalencia funcional de aquellas secuencias y que no podría esperarse razonablemente que se hubieran producido por casualidad al azar. Tal similitud de secuencias con respecto a polipéptidos puede determinarse usando el programa bl2seq públicamente disponible del paquete de programas BLAST (versión 2.2.5 [Nov 2002]) de NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>). La similitud de secuencias de polipéptidos puede examinarse usando los siguientes parámetros de la línea de comandos de Unix:

```
bl2seq -i peptideseq1 -j peptideseq2 -F F -p blastp
```

25 Secuencias de polipéptidos de variante preferentemente presentan un valor de E de inferior a  $1 \times 10^{-6}$  más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-9}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-12}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-15}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-18}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-21}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-30}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-40}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-50}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-60}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-70}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-80}$ , más preferentemente inferior a  $1 \times 10^{-90}$  y lo más preferentemente  $1 \times 10^{-100}$  cuando se comparan con una cualquiera de las secuencias específicamente identificadas.

El parámetro -F F apaga el filtrado de secciones de baja complejidad. El parámetro -p selecciona el algoritmo apropiado para el par de secuencia. Este programa encuentra regiones de similitud entre las secuencias y para cada región tal informa un "valor de E" que es el número esperado de veces que podría esperarse ver una coincidencia tal por casualidad en una base de datos de un tamaño de referencia fijo que contiene secuencias al azar. Para valores de E pequeños, muy inferiores a uno, éste es aproximadamente la probabilidad de una coincidencia al azar tal.

40 También se prevén sustituciones conservativas de uno o varios aminoácidos de una secuencia de polipéptidos descrita sin alterar significativamente su actividad biológica. Un experto conocerá métodos de preparación de sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas (véase, por ejemplo, Bowie et al., 1990, Science 247, 1306).

#### Construcciones, vectores y componentes de los mismos

45 El término "construcción genética" se refiere a una molécula de polinucleótido, normalmente ADN bicatenario, que puede tener insertada en ella otra molécula de polinucleótido (la molécula de polinucleótido de inserción) tal como, pero no se limita a, una molécula de ADNc. Una construcción genética puede contener los elementos necesarios que permiten transcribir la molécula de polinucleótido de inserción, y, opcionalmente, traducir el transcrito en un polipéptido. La molécula de polinucleótido de inserción puede derivarse de la célula huésped, o puede derivarse de una célula u organismo diferente y/o puede ser un polinucleótido recombinante. Una vez dentro de la célula huésped, la construcción genética puede llegar a integrarse en el ADN cromosómico del huésped. La construcción genética puede ligarse a un vector.

55 El término "vector" se refiere a una molécula de polinucleótido, normalmente ADN bicatenario, que se usa para transportar la construcción genética en una célula huésped. El vector puede ser capaz de replicación en al menos un sistema de huésped adicional, tal como *E. coli*.

60 El término "construcción de expresión" se refiere a una construcción genética que incluye los elementos necesarios que permiten transcribir la molécula de polinucleótido de inserción, y, opcionalmente, traducir el transcrito en un polipéptido. Una construcción de expresión normalmente comprende en una dirección 5' a 3':

- a) un promotor funcional en la célula huésped en la que la construcción se transformará,
- b) el polinucleótido que va a expresarse, y
- 65 c) un terminador funcional en la célula huésped en el que la construcción se transformará.

El término “región codificante” o “marco de lectura abierto” (ORF) se refiere a la hebra codificante de una secuencia de ADN genómico o una secuencia de ADNc que es capaz de producir un producto de transcripción y/o un polipéptido bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. La secuencia codificante se identifica por la presencia de un codón de iniciación de la traducción 5' y un codón de terminación de la traducción 3'. Cuando se inserta en una construcción genética, una “secuencia codificante” es capaz de ser expresada cuando está operativamente ligada a secuencias promotoras y terminadoras.

“Operativamente ligadas” significa que las secuencias que van a expresarse se colocan bajo el control de elementos reguladores que incluyen promotores, elementos reguladores específicos de tejido, elementos reguladores temporales, potenciadores, represores y terminadores.

El término “región no codificante” se refiere a secuencias no traducidas que están en la dirección 5' del sitio de inicio traduccional y en la dirección 3' del sitio de terminación traduccional. Estas secuencias también se denominan respectivamente 5' UTR y 3' UTR. Estas regiones incluyen elementos requeridos para el inicio y terminación de la transcripción y para la regulación de la eficiencia de traducción.

Los terminadores son secuencias que terminan la transcripción, y se encuentran en los extremos no traducidos 3' de genes en la dirección 3' de la secuencia traducida. Los terminadores son determinantes importantes de la estabilidad del ARNm y en algunos casos se ha encontrado que tienen funciones reguladoras espaciales.

El término “promotor” se refiere a elementos reguladores en cis no transcritos en la dirección 5' de la región codificante que regulan la transcripción génica. Los promotores comprenden elementos iniciadores en cis que especifican el sitio de iniciación de la transcripción y cajas conservadas tales como la caja TATA, y motivos que están unidos por factores de transcripción.

Un promotor puede ser homólogo con respecto al polinucleótido que va a expresarse. Esto significa que un promotor y polinucleótido se encuentran operativamente ligados en la naturaleza.

Alternativamente, un promotor puede ser heterólogo con respecto al polinucleótido que va a expresarse. Esto significa que un promotor y el polinucleótido no se encuentran operativamente ligados en la naturaleza.

Un “transgén” es un polinucleótido que se toma de un organismo y se introduce en un organismo diferente por transformación. El transgén puede derivarse de la misma especie o de una especie diferente a la especie del organismo en la que el transgén se introduce.

Una “repetición invertida” es una secuencia que se repite, en la que la segunda mitad de la repetición está en la hebra complementaria, por ejemplo,

(5')GATCTA.....TAGATC(3')  
(3')CTAGAT.....ATCTAG(5')

La transcripción de ultralectura producirá un transcrito que se somete a apareamiento de bases complementarias para formar una estructura de horquilla a condición de que haya un espaciador de 3-5 pb entre las regiones repetidas.

*Células huésped*

Las células huésped pueden derivarse de, por ejemplo, organismos bacterianos, fúngicos, de insecto, de mamífero o de planta.

Una “planta transgénica” se refiere a una planta que contiene material genético nuevo como resultado de la manipulación o transformación genética. El nuevo material genético puede derivarse de una planta de la misma especie como la planta transgénica resultante o de una especie diferente.

Los solicitantes han mostrado sorprendentemente que las plantas transformadas para reducir la expresión del polipéptido de SEQ ID NO: 1 producen fruta con elevada vida de almacenamiento poscosecha.

Las plantas tienen, o son capaces de producir, fruta con las siguientes características:

- a) elevada firmeza,
- b) pérdida de agua reducida,
- c) separación de células reducida,
- d) elevada jugosidad,
- e) elevada capacidad de crujir,
- f) elevada cerosidad, y
- g) reducida susceptibilidad a patógenos necrofitos.

En el presente documento se describen construcciones de expresión adecuadas para reducir la expresión del polipéptido de SEQ ID NO: 1 o variantes del mismo. También se describen células vegetales y plantas que comprenden las construcciones de expresión.

- 5 También se proporcionan métodos para producir, y seleccionar plantas, con elevada vida de almacenamiento poscosecha, con respecto a plantas de control adecuadas.

Plantas de control adecuadas incluyen plantas no transformadas de la misma especie o variedad o plantas transformadas con construcciones de control.

10

*Métodos de aislamiento o producción de polinucleótidos*

Las moléculas de polinucleótidos de la invención pueden aislarse usando una variedad de técnicas conocidas para aquellos expertos habituales en la materia. A modo de ejemplo, tales polipéptidos pueden aislarse mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en Mullis et al., Eds. 1994 The Polymerase Chain Reaction, Birkhauser, incorporada en el presente documento por referencia. Los polipéptidos de la invención pueden amplificarse usando cebadores, como se definen en el presente documento, derivados de las secuencias de polinucleótidos de la invención.

15

Otros métodos de aislamiento de los polinucleótidos descritos en el presente documento incluyen el uso de todos, o porciones de, los polipéptidos que tienen la secuencia expuesta en el presente documento como sondas de hibridación. La técnica de hibridar sondas de polinucleótidos marcadas con polinucleótidos inmovilizados sobre soportes sólidos tales como filtros de nitrocelulosa o membranas de nailon puede usarse para cribar las bibliotecas de ADN genómico o ADNc. Condiciones de hibridación y de lavado a modo de ejemplo son: hibridación durante 20 horas a 65 °C en 5,0 X SSC, 0,5 % de dodecilsulfato de sodio, 1 X disolución de Denhardt; lavado (tres lavados de veinte minutos cada uno a 55 °C) en 1,0 X SSC, 1 % (peso/volumen) de dodecilsulfato de sodio, y opcionalmente un lavado (durante veinte minutos) en 0,5 X SSC, 1 % (peso/volumen) de dodecilsulfato de sodio, a 60 °C. Puede realizarse un lavado adicional opcional (durante veinte minutos) en condiciones de 0,1 X SSC, 1 % (peso/volumen) de dodecilsulfato de sodio, a 60 °C.

20

25

30

Los fragmentos de polinucleótidos descritos en el presente documento pueden producirse por técnicas muy conocidas en la técnica, tales como digestión con endonucleasa de restricción, síntesis de oligonucleótidos y amplificación por PCR.

35

Puede usarse una secuencia de polinucleótidos parcial en los métodos muy conocidos en la técnica para identificar la secuencia de polinucleótidos de longitud completa correspondiente. Tales métodos incluyen métodos basados en PCR, 5'RACE (Frohman MA, 1993, Methods Enzymol. 218: 340-56) y método basado en hibridación, métodos basados en ordenador/bases de datos. Además, a modo de ejemplo, la PCR inversa permite la adquisición de secuencias desconocidas, que flanquean las secuencias de polinucleótidos desveladas en el presente documento, empezando con cebadores basados en una región conocida (Triglia et al., 1998, Nucleic Acids Res 16, 8186, incorporado en el presente documento por referencia). El método usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. El fragmento se circulariza entonces por ligación intramolecular y se usa como molde de PCR. Se diseñan cebadores divergentes a partir de la región conocida. Con el fin de ensamblar físicamente clones de longitud completa, pueden utilizarse enfoques estándar de biología molecular (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987).

40

45

Puede ser beneficioso, cuando se produce una planta transgénica a partir de una especie particular, transformar una planta tal con una secuencia o secuencias derivadas de esa especie. El beneficio puede ser atenuar inquietudes públicas referentes a la transformación de especies cruzadas en la generación de organismos transgénicos. Adicionalmente, cuando la regulación por disminución de un gen es el resultado deseado, puede ser necesario utilizar una secuencia idéntica (o al menos altamente similar) a aquella en la planta, para la que se desea expresión reducida. Por estos motivos, entre otros, se desea ser capaz de identificar y aislar ortólogos de un gen particular en varias especies de plantas diferentes.

50

55

Pueden identificarse variantes (incluyendo ortólogos) por los métodos descritos.

*Métodos de identificación de variantes*

*Métodos físicos*

60

Pueden identificarse polipéptidos de variante usando métodos basados en PCR (Mullis et al., Eds. 1994 The Polymerase Chain Reaction, Birkhauser). Normalmente, la secuencia de polinucleótidos de un cebador, útil para amplificar variantes de moléculas de polinucleótidos de la invención por PCR, puede basarse en una secuencia que codifica una región conservada de la secuencia de aminoácidos correspondiente.

65

Alternativamente, pueden emplearse métodos de cribado de bibliotecas, muy conocidos para aquellos expertos en la materia (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987). Cuando se identifican variantes de la secuencia de la sonda, la rigurosidad de la hibridación y/o de los lavados normalmente se reducirá relativamente a cuando se buscan coincidencias de secuencias exactas.

5 También pueden identificarse variantes de polipéptido por métodos físicos, por ejemplo, cribando bibliotecas de expresión usando anticuerpos producidos contra polipéptidos de la invención (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987) o identificando polipéptidos de fuentes naturales con la ayuda de tales anticuerpos.

#### 10 *Métodos basados en ordenador*

Las secuencias de variantes de la invención, que incluyen tanto variantes de polinucleótidos como de polipéptidos, también pueden identificarse por métodos basados en ordenador muy conocidos para aquellos expertos en la materia, usando algoritmos de alineamiento de secuencias de dominio público y herramientas de búsqueda de similitud de secuencias para buscar bases de datos de secuencias (bases de datos de dominio público incluyen Genbank, EMBL, Swiss-Prot, PIR y otras). Véase, por ejemplo, *Nucleic Acids Res.* 29: 1-10 y 11-16, 2001 para ejemplos de recursos en línea. Las búsquedas de similitud recuperan y alinean secuencias diana para la comparación con una secuencia que va a analizarse (es decir, una secuencia de búsqueda). Los algoritmos de comparación de secuencias usan matrices de puntuación para asignar una puntuación global a cada uno de los alineamientos.

Una familia a modo de ejemplo de programas útiles para identificar variantes en bases de datos de secuencias es el paquete de programas BLAST (versión 2.2.5 [Nov 2002]) que incluye BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN y tBLASTX, que están públicamente disponibles de (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>) o del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI), Biblioteca Nacional de Medicina, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894 EE.UU. El servidor del NCBI también proporciona el servicio de usar los programas para cribar varias bases de datos de secuencias públicamente disponibles. BLASTN compara una secuencia de búsqueda de nucleótidos con una base de datos de secuencias de nucleótidos. BLASTP compara una secuencia de búsqueda de aminoácidos con una base de datos de secuencias de proteínas. BLASTX compara una secuencia de búsqueda de nucleótidos traducida en todos los marcos de lectura con una base de datos de secuencias de proteínas. tBLASTN compara una secuencia de búsqueda de proteínas con una base de datos de secuencias de nucleótidos dinámicamente traducida en todos los marcos de lectura. tBLASTX compara las traducciones en los seis marcos de una secuencia de búsqueda de nucleótidos con las traducciones en los seis marcos de una base de datos de secuencias de nucleótidos. Los programas BLAST pueden usarse con parámetros por defecto o los parámetros pueden alterarse según se requiera para refinar el cribado.

El uso de la familia BLAST de algoritmos, que incluyen BLASTN, BLASTP y BLASTX, se describe en la publicación de Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997.

Los "aciertos" con una o más secuencias de las bases de datos por una secuencia buscada producidos por BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN, tBLASTX, o un algoritmo similar, alinean e identifican porciones de secuencias similares. Los aciertos están dispuestos en orden del grado de similitud y la longitud de solapamiento de secuencias. Los aciertos para una secuencia de base de datos generalmente representan un solapamiento sobre solo una fracción de la longitud de secuencia de la secuencia buscada.

Los algoritmos BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN y tBLASTX también producen valores "esperados" para alineamientos. El valor esperado (E) indica el número de aciertos que puede "esperarse" ver por casualidad cuando se busca en una base de datos del mismo tamaño que contiene secuencias contiguas al azar. El valor esperado se usa como umbral de significancia para determinar si el éxito con una base de datos indica similitud real. Por ejemplo, un valor de E de 0,1 asignado a un acierto de polinucleótido se interpreta que significa que en una base de datos del tamaño de la base de datos cribada podría esperarse ver 0,1 coincidencias sobre la porción alineada de la secuencia con una puntuación similar simplemente por casualidad. Para secuencias que tienen un valor de E de 0,01 o menos sobre las porciones alineadas y coincidentes, la probabilidad de encontrar una coincidencia por casualidad en esa base de datos es del 1 % o menos usando el algoritmo BLASTN, BLASTP, BLASTX, tBLASTN o tBLASTX.

Pueden llevarse a cabo múltiples alineamientos de secuencias de un grupo de secuencias relacionadas con CLUSTALW (Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680, <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalW/Top.html>) o T-COFFEE (Cedric Notredame, Desmond G. Higgins, Jaap Heringa, T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment, *J. Mol. Biol.* (2000) 302: 205-217) o PILEUP, que usa alineamientos por parejas progresivos (Feng and Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 25, 351).

65

Están disponibles aplicaciones de software de reconocimiento de patrones para encontrar motivos o secuencias distintivas. Por ejemplo, MEME (múltiples Em para la obtención de motivos) encuentra motivos y secuencias distintivas en un conjunto de secuencias y MAST (alineamiento de motivos y herramienta de búsqueda) usa estos motivos para identificar motivos similares o los mismos motivos en secuencias de búsqueda. Los resultados de MAST se proporcionan como una serie de alineamientos con datos estadísticos apropiados y una visión general visual de los motivos encontrados. MEME y MAST se desarrollaron en la Universidad de California, San Diego.

PROSITE (Bairoch y Bucher, 1994, Nucleic Acids Res. 22, 3583; Hofmann et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27, 215) es un método de identificación de las funciones de proteínas sin caracterizar traducidas de secuencias de ADN genómico o de ADNc. La base de datos PROSITE ([www.expasy.org/prosite](http://www.expasy.org/prosite)) contiene patrones y perfiles biológicamente significativos y se diseña de manera que pueda usarse con herramientas computacionales apropiadas para asignar una nueva secuencia a una familia de proteínas conocida o para determinar qué dominio(s) conocido(s) está(n) presentes en la secuencia (Falquet et al., 2002, Nucleic Acids Res. 30, 235). Prosearch es una herramienta que puede buscar en las bases de datos SWISS-PROT y EMBL con un patrón de secuencia dado o distintivo.

#### *Métodos de aislamiento de polipéptidos*

Los polipéptidos descritos en el presente documento, que incluyen polipéptidos de variante, pueden prepararse usando métodos de síntesis de péptidos muy conocidos en la técnica tales como síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida (por ejemplo, Stewart et al., 1969, en Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co, San Francisco California, o síntesis automatizada, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos 431A de Applied Biosystems (Foster City, California). También pueden producirse formas mutadas de los polipéptidos durante tales síntesis.

Los polipéptidos y polipéptidos de variante también pueden purificarse de fuentes naturales usando una variedad de técnicas que son muy conocidas en la técnica (por ejemplo, Deutscher, 1990, Ed, Methods in Enzymology, Vol. 182, Guide to Protein Purification).

Alternativamente, los polipéptidos y polipéptidos de variante pueden expresarse recombinantemente en células huésped adecuadas y separarse de las células como se trata más adelante.

#### *Métodos de producción de construcciones y vectores*

Las construcciones genéticas descritas en el presente documento comprenden una o más secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento, y pueden ser útiles para transformar, por ejemplo, organismos bacterianos, fúngicos, de insecto, de mamífero o de planta. Las construcciones genéticas de la invención pretenden incluir construcciones de expresión como se definen en el presente documento.

Los métodos de producción y uso de construcciones genéticas y vectores son muy conocidos en la técnica y se describen generalmente en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, 1987).

#### *Métodos de producción de células huésped que comprenden polinucleótidos, construcciones o vectores*

En el presente documento se describe una célula huésped que comprende una construcción genética o vector descrito en el presente documento.

Las células huésped que comprende construcciones genéticas, tales como construcciones de expresión, de la invención son útiles en métodos muy conocidos en la técnica (por ejemplo Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, 1987) para la producción recombinante de polipéptidos de la invención. Tales métodos pueden implicar el cultivo de células huésped en un medio apropiado en condiciones adecuadas para o propicias para la expresión de un polipéptido de la invención. El polipéptido recombinante expresado, que opcionalmente puede secretarse en el cultivo, puede entonces separarse del medio, células huésped o medio de cultivo por métodos muy conocidos en la técnica (por ejemplo, Deutscher, Ed, 1990, Methods in Enzymology, Vol 182, Guide to Protein Purification).

#### *Métodos de producción de células vegetales y plantas que comprenden construcciones y vectores*

En el presente documento también se describen células vegetales que comprenden una construcción genética descrita en el presente documento, y células vegetales modificadas para alterar la expresión de un polinucleótido o polipéptido descrito en el presente documento, o usado en los métodos de la invención. También se proporcionan plantas que comprenden tales células.

La alteración de las características de almacenamiento poscosecha puede alterarse en una planta mediante métodos de la invención. Tales métodos pueden implicar la transformación de células vegetales y plantas, con una construcción diseñada para alterar la expresión de un polinucleótido o polipéptido que modula las características de almacenamiento poscosecha en tales plantas. Tales métodos también incluyen la transformación de células vegetales y plantas con una combinación de la construcción descrita en el presente documento y una o varias de otras construcciones diseñadas para alterar la expresión de uno o más polinucleótidos o polipéptidos que modulan las características de almacenamiento poscosecha en plantas.

Métodos de transformación de células vegetales, plantas y porciones de las mismas con polipéptidos se describen en Draper et al., 1988, *Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual*. Blackwell Sci. Pub. Oxford, p. 365; Potrykus and Spangenburg, 1995, *Gene Transfer to Plants*. Springer-Verlag, Berlin; y Gelvin et al., 1993, *Plant Molecular Biol. Manual*. Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. Una revisión de plantas transgénicas, que incluyen técnicas de transformación, se proporciona en Galun and Breiman, 1997, *Transgenic Plants*. Imperial College Press, London.

#### *Métodos para la manipulación genética de plantas*

Están disponibles varias estrategias de transformación de plantas (por ejemplo, Birch, 1997, *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol*, 48, 297, Hellens RP, et al (2000) *Plant Mol Biol* 42: 819-32, Hellens R et al *Plant Meth* 1: 13). Por ejemplo, pueden diseñarse estrategias para aumentar la expresión de un polinucleótido/polipéptido en una célula de planta, órgano y/o en una etapa de desarrollo particular en la que/cuando normalmente se expresa o para expresar ectópicamente un polinucleótido/polipéptido en una célula, tejido, órgano y/o en una etapa de desarrollo particular que/cuando no se expresa normalmente. El polinucleótido/polipéptido expresado puede derivarse de la especie de planta que va a transformarse o puede derivarse de una especie de planta diferente.

Pueden diseñarse estrategias de transformación para reducir la expresión de un polinucleótido/polipéptido en una célula de planta, tejido, órgano o en una etapa de desarrollo particular que/cuando normalmente se expresa. Tales estrategias son conocidas como estrategias de silenciamiento génico.

Las construcciones genéticas para la expresión de genes en plantas transgénicas normalmente incluyen promotores para conducir la expresión de uno o más polinucleótidos clonados, terminadores y secuencias de marcadores de selección para detectar la presencia de la construcción genética en la planta transformada.

Los promotores adecuados para su uso en las construcciones descritas en el presente documento son funcionales en una célula, tejido u órgano de una planta monocotiledónea o dicotiledónea e incluyen promotores específicos de célula, tejido y órgano, promotores específicos del ciclo celular, promotores temporales, promotores inducibles, promotores constitutivos que son activos en la mayoría de los tejidos de planta y promotores recombinantes. La elección del promotor dependerá de la expresión temporal y espacial del polinucleótido clonado, así deseado. Los promotores pueden ser aquellos normalmente asociados a un transgén de interés, o promotores que se derivan de genes de otras plantas, virus y bacterias patógenas de plantas y hongos. Aquellos expertos en la materia serán capaces de seleccionar, sin excesiva experimentación, promotores que son adecuados para su uso en modificar y modular los rasgos de plantas usando construcciones genéticas que comprenden las secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento. Ejemplos de promotores de plantas constitutivos incluyen el promotor 35S del CaMV, el promotor de nopalina sintasa y el promotor de octopina sintasa, y el promotor Ubi 1 de maíz. Promotores de plantas que son activos en tejidos específicos que responden a señales de desarrollo internas o estrés abiótico o biótico externo se describen en la bibliografía científica. Promotores a modo de ejemplo se describen, por ejemplo, en el documento WO 02/00894.

Terminadores a modo de ejemplo que se usan comúnmente en la construcción genética de transformación de plantas incluyen, por ejemplo, el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), los terminadores de nopalina sintasa u octopina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, el terminador del gen de zeína de *Zea mays*, el terminador de ADP-glucosa pirofosforilasa de *Oryza sativa* y el terminador PI-II de *Solanum tuberosum*.

Marcadores de selección comúnmente usados en la transformación de plantas incluyen el gen neomicina fosfotransferasa II (NPT II) que confiere resistencia a kanamicina, el gen aadA, que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin, fosfinotricina acetil transferasa (gen *bar*) para resistencia a Ignite (AgrEvo) y Basta (Hoechst), y el gen higromicina fosfotransferasa (hpt) para resistencia a higromicina.

También se contempla el uso de construcciones genéticas que comprenden genes indicadores (secuencias codificantes que expresan una actividad que es extraña para el huésped, normalmente una actividad enzimática y/o una señal visible (por ejemplo, luciferasa, GUS, GFP) que puede usarse para el análisis de expresión de promotores en plantas y tejidos de planta. La bibliografía de genes indicadores se revisa en Herrera-Estrella et al., 1993, *Nature* 303, 209, y Schrott, 1995, en: *Gene Transfer to Plants* (Potrykus, T., Spangenberg, Eds) Springer Verlag, Berlin, pp. 325-336.

Las estrategias de silenciamiento génico pueden centrarse en el propio gen o elementos reguladores que afectan la expresión del polipéptido codificado. "Elementos reguladores" se usa aquí en el sentido más amplio posible e incluye otros genes que interaccionan con el gen de interés.

- 5 Las construcciones genéticas diseñadas para reducir o silenciar la expresión de un polinucleótido/polipéptido de la invención pueden incluir una copia antisentido de un polinucleótido descrito en el presente documento. En tales construcciones, el polinucleótido se pone en una orientación antisentido con respecto a un promotor y terminador.

10 Se obtiene un polinucleótido "antisentido" invirtiendo un polinucleótido o un segmento del polinucleótido de manera que el transcrito producido será complementario al transcrito de ARNm del gen, por ejemplo,

|                                 |                                   |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 5'GATCTA 3' (hebra codificante) | 3'CTAGA 5' (hebra no codificante) |
| 3'CUAGAU 5' ARNm                | 5'GAUCUCG 3' ARN antisentido      |

15 Las construcciones genéticas diseñadas para el silenciamiento génico también pueden incluir una repetición invertida. Una 'repetición invertida' es una secuencia que se repite donde la segunda mitad de la repetición es en la hebra complementaria, por ejemplo,

5'-GATCTA..... TAGATC-3'  
3'-CTAGAT.....ATCTAG-5'

20 El transcrito formado puede someterse a apareamiento de bases complementarias para formar una estructura de horquilla. Normalmente se requiere un espaciador de al menos 3-5 pb entre la región repetida para permitir la formación de la horquilla. Construcciones que incluyen tales secuencias de repetición inventadas pueden usarse en interferencia por ARN (iARN) y, por tanto, pueden denominarse construcciones de iARN.

25 Otro enfoque de silenciamiento implica el uso de un ARN antisentido pequeño dirigido al transcrito equivalente a un miARN (Llave et al., 2002, Science 297, 2053). Se contempla expresamente el uso de tal ARN antisentido pequeño correspondiente al polinucleótido de la invención.

30 El término construcción genética, como se usa en el presente documento, también incluye ARN antisentido pequeños y otros polipéptidos tales que afectan el silenciamiento génico.

35 La transformación con una construcción de expresión, como se define en el presente documento, puede también producir silenciamiento génico mediante un proceso conocido como supresión sentido (por ejemplo, Napoli et al., 1990, Plant Cell 2, 279; de Carvalho Niebel et al., 1995, Plant Cell, 7, 347). En algunos casos, la supresión sentido puede implicar la expresión en exceso de la secuencia codificante completa o parcial, pero también puede implicar la expresión de la región no codificante del gen, tal como un intrón o una región sin traducir de 5' o 3' (UTR). Pueden usarse construcciones sentido parciales quiméricas para silenciar coordinadamente múltiples genes (Abbott et al., 2002, Plant Physiol. 128(3): 844-53; Jones et al., 1998, Plant 204: 499-505). También se contempla el uso de tales estrategias de supresión sentido para silenciar la expresión de un polinucleótido de la invención.

40 Las inserciones de polinucleótidos en construcciones genéticas diseñadas para el silenciamiento génico pueden corresponderse con secuencia codificante y/o secuencia no codificante, tal como promotor y/o intrón y/o secuencia 5' o 3' UTR, del gen correspondiente.

45 Otras estrategias de silenciamiento génico incluyen enfoques negativos dominantes y el uso de construcciones de ribozima (McIntyre, 1996, Transgenic Res, 5, 257).

50 Puede provocarse silenciamiento pre-transcripcional mediante mutación del propio gen o sus elementos reguladores. Tales mutaciones pueden incluir mutaciones puntuales, desplazamientos del marco, inserciones, deleciones y sustituciones.

Lo siguiente son publicaciones representativas que desvelan protocolos de transformación genética que pueden usarse para transformar genéticamente las siguientes especies de planta: Arroz (Alam et al., 1999, Plant Cell Rep. 18, 572); manzana (Yao et al., 1995, Plant Cell Reports 14, 407-412); maíz (patentes de EE.UU. N.º de serie 5.177.010 y 5.981.840); trigo (Ortiz et al., 1996, Plant Cell Rep. 15, 1996, 877); tomate (patente de EE.UU. N.º de serie 5.159.135); patata (Kumar et al., 1996 Plant J. 9 : 821); yuca (Li et al., 1996 Nat. Biotechnology 14, 736); lechuga (Michelmore et al., 1987, Plant Cell Rep. 6, 439); tabaco (Horsch et al., 1985, Science 227, 1229); algodón (patentes de EE.UU. N.º de serie 5.846.797 y 5.004.863); céspedes (patentes de EE.UU. N.º 5.187.073 y 6.020.539); menta (Niu et al., 1998, Plant Cell Rep. 17, 165); plantas cítricas (Pena et al., 1995, Plant Sci, 104, 183); alcaravea (Krens et al., 1997, Plant Cell Rep, 17, 39); banana (patente de EE.UU. N.º de serie 5.792.935); soja (patentes de EE.UU. N.º 5.416.011; 5.569.834; 5.824.877; 5.563.04455 y 5.968.830); piña (patente de EE.UU. N.º de serie 5.952.543); álamo (patente de EE.UU. N.º 4.795.855); monocotiledóneas en general (patentes de EE.UU. N.º 5.591.616 y 6.037.522); brassica (patentes de EE.UU. N.º 5.188.958; 5.463.174 y 5.750.871); cereales (patente de EE.UU. N.º 6.074.877); pera (Matsuda et al., 2005, Plant Cell Rep. 24(1):45-51); Prunus (Ramesh et al., 2006 Plant

Cell Rep. 25(8):821-8; Song y Sink 2005 Plant Cell Rep. 2006; 25(2):117-23; Gonzalez Padilla et al., 2003 Plant Cell Rep, 22(1):38-45); fresa (Oosumi et al., 2006 Planta. 223(6):1219-30; Folta et al., 2006 Planta Apr 14; PMID: 16614818), rosa (Li et al., 2003), Rubus (Graham et al., 1995 Methods Mol Biol. 1995;44:129-33), tomate (Dan et al., 2006, Plant Cell Reports V25:432-441), manzana (Yao et al., 1995, Plant Cell Rep. 14, 407-412) y *Actinidia eriantha* (Wang et al., 2006, Plant Cell Rep. 25,5: 425-31). La transformación de otras especies también se contempla por la invención. Están disponibles métodos y protocolos adecuados en la bibliografía científica.

Pueden emplearse varios otros métodos conocidos en la técnica para alterar la expresión de la actividad de un nucleótido y/o polipéptido descrito en el presente documento. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, Tilling (Till et al., 2003, Methods Mol Biol, 2 %, 205), la llamada tecnología "Deletagene" (Li et al., 2001, Plant Journal 27(3), 235) y el uso de factores de transcripción artificiales tales como factores de transcripción de dedo de cinc sintéticos (por ejemplo, Jouvenot et al., 2003, Gene Therapy 10, 513). Adicionalmente, anticuerpos o fragmentos de los mismos, dirigidos a un polipéptido particular, también pueden expresarse en plantas para modular la actividad de ese polipéptido (Jobling et al., 2003, Nat. Biotechnol., 21(1), 35). También pueden aplicarse enfoques de marcado de transposón. Adicionalmente pueden identificarse péptidos que interaccionan con un polipéptido descrito en el presente documento mediante tecnologías tales como expresión en fase (Dyax Corporation). Tales péptidos que interaccionan pueden expresarse en o aplicarse a una planta para afectar la actividad de un polipéptido de la invención. Se contempla específicamente el uso de cada uno de los enfoques anteriores en la alteración de la expresión de un nucleótido y/o polipéptido de la invención.

Los términos "para alterar la expresión de" y "expresión alterada" de un polinucleótido o polipéptido en los métodos de la invención pretenden englobar la situación en la que el ADN genómico correspondiente a un polinucleótido descrito en el presente documento se modifica, conduciendo así a la expresión alterada de un polinucleótido o polipéptido de la invención. La modificación del ADN genómico puede ser mediante transformación genética u otros métodos conocidos en la técnica para inducir mutaciones. La "expresión alterada" puede relacionarse con un aumento o disminución en la cantidad de ARN mensajero y/o polipéptido producido y puede también producir actividad alterada de un polipéptido debido a alteraciones en la secuencia de un polinucleótido y polipéptido producido.

#### *Métodos de selección de plantas*

También se proporcionan métodos para seleccionar plantas con características de almacenamiento poscosecha alteradas. Tales métodos implican probar plantas para expresión alterada de un polinucleótido o polipéptido de la invención o desvelado en el presente documento. Tales métodos pueden aplicarse en una edad joven o etapa de desarrollo temprana cuando las características de almacenamiento poscosecha alteradas pueden no ser necesariamente fácilmente medibles.

La expresión de un polinucleótido, tal como un ARN mensajero, se usa frecuentemente como indicador de la expresión de un polipéptido correspondiente. Métodos a modo de ejemplo para medir la expresión de un polinucleótido incluyen, pero no se limitan a, análisis Northern, RT-PCR y análisis de transferencia puntual (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987). Los polinucleótidos o porciones de los polinucleótidos descritos en el presente documento son así útiles como sondas o cebadores, como se define en el presente documento. Los polinucleótidos desvelados en el presente documento pueden usarse como sondas en experimentos de hibridación, o como cebadores en experimentos basados en PCR, diseñados para identificar tales plantas.

Alternativamente, pueden producirse anticuerpos contra polipéptidos descritos en el presente documento, o usados en los métodos descritos en el presente documento. Métodos para producir y usar anticuerpos son estándar en la materia (véase, por ejemplo: Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow A Lane, Eds, Cold Spring Harbour Laboratory, 1998). Tales anticuerpos pueden usarse en métodos para detectar la expresión alterada de polipéptidos que modulan el tamaño de la flor en plantas. Tales métodos pueden incluir ELISA (Kemeny, 1991, A Practical Guide to ELISA, NY Pergamon Press) y análisis Western (Towbin & Gordon, 1994, J Immunol Methods, 72, 313).

Estos enfoques para el análisis de la expresión de polinucleótidos o polipéptidos y la selección de plantas con características de almacenamiento poscosecha alteradas son útiles en programas de cultivo convencionales diseñados para producir variedades con características de almacenamiento poscosecha alteradas.

#### *Plantas*

El término "planta" pretende incluir una planta entera, cualquier parte de una planta, una semilla, una fruta, propágulas y progenie de una planta.

El término 'propágula' significa cualquier parte de una planta que pueda usarse en la reproducción o propagación, tanto sexual como asexual, que incluye semillas y esquejes.

Las plantas descritas en el presente documento pueden cultivarse y tanto autofecundarse como cruzarse con una cepa de planta diferente y pueden identificarse los híbridos resultantes, con las características fenotípicas deseadas. Pueden cultivarse dos o más generaciones para garantizar que las características fenotípicas objeto se mantengan o hereden establemente.

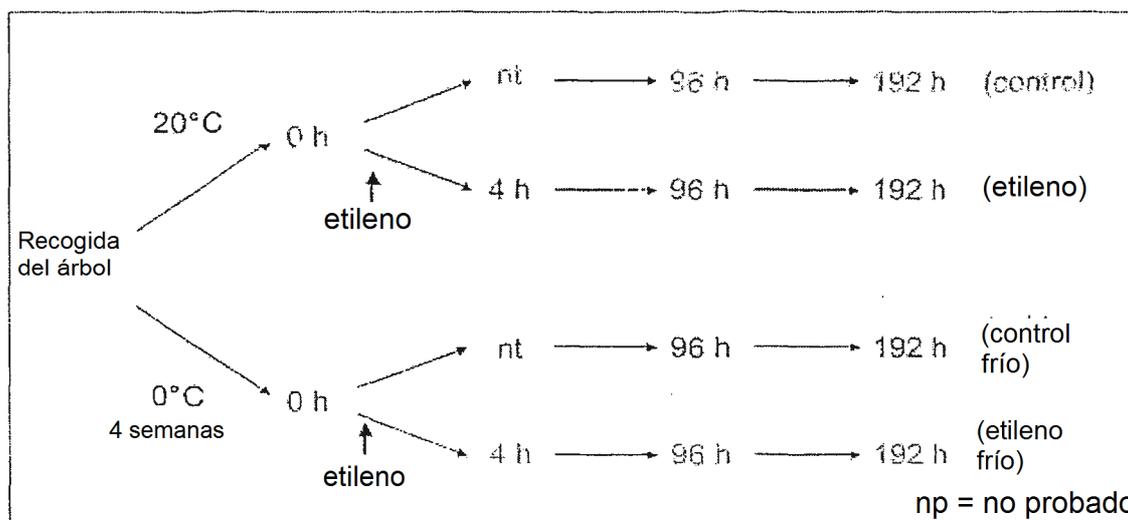
5 Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entenderá mejor con referencia a los dibujos adjuntos en los que se describe como sigue:

10 Fig. 1: Selección de MdPG1 como gen clave en la maduración de fruta de manzana

A) El diagrama de Venn muestra EST que cambiaron significativamente en la expresión usando análisis de micromatrices de ARN derivado de tres tratamientos diferentes como se describe a continuación: Desarrollo de la fruta: 8 momentos de tiempo desde la antesis hasta la fruta madura, 0, 14, 25, 35, 60, 87, 132 y 146 días después de la floración plena. Inducción de etileno: Manzanas mutantes inactivadas para etileno indujeron la maduración con etileno, y se recogieron 0, 4, 18, 96 y 192 horas después de la inducción de etileno. También se midió un control (C) de 192 horas. Inducción del almacenamiento: Se compararon tres cultivares diferentes de manzanas entre sí antes del almacenamiento (comparaciones de cultivares) y después del almacenamiento a 0 °C durante 4 semanas. Los perfiles de expresión de los 143 genes relacionados con la pared celular se evaluaron en 3 experimentos de micromatriz no relacionados que cubrieron periodos de ablandamiento fisiológico de la fruta: Se realizaron experimentos en micromatriz y se analizaron como se describe en Schaffer et al (2007).

20 B) Patrón de expresión relativa de MdPG1 medida usando qPCR  
Se extrajeron muestras de ARN de manzanas mutantes para ACC oxidasa para medir los efectos del ablandamiento inducido por etileno sobre la expresión de PG con o sin un tratamiento por almacenamiento en frío. Los momentos de tiempo analizados por qPCR se muestran en el esquema a continuación



30 Se sintetizó ADNc a partir de 2 ug de ARN total en un volumen total de 50 ml con transcriptasa inversa Superscript III según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Se usaron controles con transcriptasa inversa no Superscript III para evaluar la posible contaminación por ADN genómico. Se sintetizó ADNc usado para RT-PCR en tiempo real por triplicado y se midió la densidad óptica para cada muestra. Se realizaron reacciones de qPCR y normalización como se describe en Schaffer et al (1998). Los resultados muestran la fuerte inducción de la expresión de MdPG1 por tratamiento con etileno después de 96 h y 192 h y por tratamiento con frío + etileno a las 96 h y 192 h. La expresión de MdPG1 se induce por tratamiento con frío solo pero más lentamente (después de 192 h).

Fig. 2: Firmeza en plantas transgénicas inactivadas para PG frente a controles Royal Gala

40 Se midió la firmeza de la fruta destructivamente en fruta individual (n = 6-10 frutas por momento de tiempo) en la cosecha, después de 2 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente (~20 °C) y después de 16 semanas de almacenamiento a 5 °C.

45 Se midió la firmeza usando una prueba de perforación según la práctica de la industria estándar (Blanpied et al., 1978). Esto implicó la eliminación localizada de la piel de dos localizaciones opuestas sobre el ecuador de la fruta, y registrar la fuerza máxima mientras que se movía una sonda cilíndrica de 7,9 mm en la corteza externa a una profundidad constante (8 mm) a una velocidad fija (4 mm/s). La prueba de perforación y la captura de datos se realizaron usando un Stable Micro Systems TA-XT plus Texture Analyser (Hertog et al 2001).

- A) Firmeza de la fruta en 10 líneas inactivadas frente a control RG (Royal Gala).  
 B) Medición de la firmeza de la fruta expresada como un % de firmeza en la cosecha.

SPI = Las mediciones del índice del patrón de almidón se hicieron contra patrones comerciales.

5 Fig. 3: Análisis Western de niveles de proteína PG en fruta de manzana transgénica Royal Gala en la cosecha

Se molieron tejidos de fruta dando un polvo con mortero y pistilo bajo nitrógeno líquido. Se extrajo proteína como se describe en Langenkapmper et al (1998). Las proteínas se separaron en 12 % (peso/volumen) de geles de SDS-Tris-tricina usando un sistema de electroforesis Mini-PROTEAN3 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Las concentraciones de proteína en cada muestra se midieron usando el sistema de cuantificación QuBit (Invitrogen) y se verificaron sobre geles por tinción con Coomassie. Se usó un anticuerpo policlonal producido para poligalacturonasa de manzana para inmunolocalizar la proteína PG en plantas de manzana Royal Gala transgénicas y de control.

15 Marcador = Precision Plus Protein Dual Colour Standards (Bio-Rad), el tamaño es en kDa.

Fig. 4: Análisis Western de niveles de proteína PG en fruta de manzana transgénica Royal Gala después de 2 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente (~20 °C)

20 Se extrajeron muestras de proteína y se analizaron como se describe en la Fig. 3.

Fig. 5: Análisis Western de niveles de proteína PG en fruta de manzana Royal Gala transgénica después de 4 semanas de almacenamiento a 5 °C

25 Se extrajeron muestras de proteína y se analizaron como se describe en la Fig. 3.

Fig. 6: Análisis Western de niveles de proteína PG en fruta de manzana Royal Gala transgénica después de 16 semanas de almacenamiento a 5 °C

30 Se extrajeron muestras de proteína y se analizaron como se describe en la Fig. 3.

Fig. 7: Análisis Western de niveles de proteína PG en seis frutas de manzana Royal Gala transgénica seleccionadas

Se extrajeron muestras de proteína y se analizaron como se describe en la Fig. 3.

35 R = fruta en la cosecha  
 2 s = fruta después de 2 semanas de almacenamiento a 5 °C  
 16 s = fruta después de 16 semanas de almacenamiento a 5 °C  
 M = marcador, Precision Plus Protein Dual Colour Patrones (Bio-Rad)

40 Fig. 8: Tasa de pérdida de agua en fruta transgénica frente a de control

A - Tasa de pérdida de agua de fruta inactivada para PG y Royal Gala después de 16 semanas de almacenamiento a 5 °C, seguido de 5 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente. La pérdida de agua se expresa como gramos de peso perdidos por día por g de peso fresco de la fruta. Cada barra representa una fruta individual. Conclusión: En comparación con fruta RG (Royal Gala) de control, las dos líneas en las que PG se ha regulado por disminución más fuertemente (líneas PG41 y PG275) muestran la tasa de pérdida de agua más baja.

50 B - Comparación de pérdida de agua de fruta Royal Gala de control y fruta en la que el gen ACC oxidasa de manzana se ha inactivado (véase Schaffer et al 1998 para la descripción de esta línea). Nb, esta fruta no se almacenó en frío, sugiriendo que el almacenamiento en frío de las manzanas puede acelerar adicionalmente la pérdida de agua.

55 Fig. 9: Arrugamiento reducido en fruta transgénica Royal Gala regulado por disminución para PG en comparación con fruta de control Royal Gala

Se almacenó fruta durante 16 semanas a 5 °C, luego se transfirió a temperatura ambiente durante 5 semanas a temperatura ambiente. Después de este periodo la fruta transgénica estuvo sustancialmente menos arrugada en comparación con los controles, que se correlaciona con la pérdida reducida de agua de esta fruta.

60 Fig. 10: Secciones teñidas con azul de toluidina de manzana de control Royal Gala y línea inactivada para PG PG41

Se fijaron secciones de corteza de fruta de manzana en glutaraldehído y se incorporaron en resina LR-white. Se tiñeron secciones delgadas de 1 uM con azul de toluidina (0,1 %). Se prepararon secciones a partir de fruta de control Royal Gala y la línea inactivada para PG PG41 se guardó durante 16 semanas a 5 °C. Las flechas indican puntos de adhesión de pectina.

65

NB en fruta de control, la adhesión se reduce mientras que en las líneas PG41 la adhesión se mantiene. Esta diferencia tendrá un efecto sobre el ablandamiento y la textura de la fruta.

Fig. 11: Inmunolocalización de pectina no esterificada de control Royal Gala y línea inactivada para PG PG41

Se realizó fijación de tejidos de fruta de manzana e inmunolocalización usando anticuerpos JIM5 como se describe en Atkinson et al. (2002). Las secciones se prepararon a partir de fruta de control Royal Gala y la línea inactivada para PG PG41 se guardó durante 16 semanas a 5 °C. Aumentos = x40. Las flechas indican puntos de fluorescencia de JIM5.

NB en fruta de control, la fluorescencia se reduce mientras que en las líneas PG41 la fluorescencia es más fuerte. Este resultado sugiere que está presente más homogalacturonano desmetilado en los puntos de unión entre las células en fruta PG41 frente a fruta de control. Esta diferencia tendrá un efecto sobre el ablandamiento y la textura de la fruta.

Fig. 12: Resistencia a la tracción [separación] (panel superior) y firmeza de la carne medida con una sonda de 8 mm (panel inferior) para fruta de las líneas PG41 frente a líneas de control (Royal Gala) en la cosecha (barras amarillas) y después de 10 semanas de almacenamiento a 0,5 °C (barras magenta).

Fig. 13: Secuencia de aminoácidos de MDPG1 resaltados los dominios de poligalacturonasa conservados

La Figura 13 muestra la posición de cuatro dominios conservados (I a IV) que están presentes en las secuencias de planta y fúngicas (Torki et al. 2000 (incorporado en el presente documento por referencia)). El grupo carboxilato en los tres ácidos aspárticos en estructuras NTD y DD (dominios I y II, respectivamente) puede ser un componente del sitio catalítico y se cree que el resto de histidina en el dominio III participa en la reacción catalítica. El dominio IV (RIK) positivamente cargado bien conservado constituye un posible candidato para las interacciones iónicas con grupos carboxilato presentes en el sustrato.

## Ejemplos

La invención se ilustrará ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1: Selección de MdPG1 como gen candidato para alterar la vida de almacenamiento poscosecha en fruta de manzana

Se analizaron tres experimentos de micromatrices que midieron manzanas que se sometieron a maduración. Éstos incluyeron una serie de maduración inducida por etileno (Schaffer et al 2007), una serie de desarrollo de fruta (Janssen et al 2008) y un tratamiento por almacenamiento en frío (manuscrito en preparación). Se identificaron 290 genes relacionados con la pared celular por cribado de homología en la colección HortResearch Apple EST. De éstos, 10 aumentaron en la expresión tarde en el desarrollo de la fruta, 9 aumentaron en la expresión tras la adición de etileno exógeno, y 10 aumentaron en la expresión durante 2 meses y medio de almacenamiento en frío. De estos genes, se encontró que tres eran comunes a todos tratamientos. De los tres, MdPG1 mostró el mayor cambio en la expresión. El análisis adicional de este gen en líneas de manzana transgénicas reguladas por disminución para el gen MdACO mostró que MdPG1 está regulado por incremento en un modo de maduración dependiente de etileno y dependiente del frío (Figura 1).

Aunque la reducción de la expresión de poligalacturonasas (PG) se ha propuesto como un enfoque para mejorar las características de almacenamiento en fruta, el éxito ha sido limitado. Esto puede ser debido en parte al gran número de PG que parecen estar presentes en las plantas. Por ejemplo, se ha informado que *Arabidopsis* sola contiene aproximadamente 52 genes de PG diferentes.

Se han usado plantas transgénicas para estudiar la función de endo-PG *in vivo*. En tomate (*Lycopersicon esculentum*), la regulación por disminución del gen de PG específico de la fruta pTOM6 bajo el control del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor 35S mostró despolimerización reducida de polímeros de pectina en la fruta (Smith et al., 1990). La expresión en exceso de PG en el fondo del mutante inhibido por la maduración *rin* restauró la actividad de PG y la degradación de pectina en la fruta (Giovannoni et al., 1989). En ambos casos, solo la fruta estuvo afectada por la expresión transgénica; por tanto, el producto génico aislado de la fruta de tomate pareció tener actividad de PG específica de la fruta. Experimentos adicionales en los que el gen pTOM6 se expresó en exceso en tabaco (*Nicotiana tabacum*; Osteryoung et al., 1990) mostraron que la proteína del tomate se procesó apropiadamente y se localizó en las paredes celulares de hojas en tabaco. La enzima mostró actividad cuando se extrajo de hojas de tabaco transgénico y se probó contra extractos de la pared celular de tabaco *in vitro*. Sin embargo, no se observaron cambios en el fenotipo de la hoja, no hubo alteraciones a las pectinas en las paredes celulares del tabaco *in vivo*. Por lo tanto, la expresión y el gen de PG dado en plantas pueden dar resultados impredecibles.

La manzana (*Malus domestica* Borkh. cv Royal Gala) madura de forma muy diferente del tomate y muchas otras frutas (Redgwell et al. 2008a; 2008b), debido a que el hinchamiento de la pared celular no es una de las

modificaciones de la pared celular que se producen durante la maduración de la manzana (Redgwell et al., 1997). Hay cambio mínimo en la viscosidad de las paredes celulares, y solubilización o degradación mínima de pectina durante la maduración de la fruta. Esto implica que cualquier endo-PG aislada de fruta de manzana en maduración puede tener características diferentes a endo-PG aisladas de fruta de tomate en maduración. En una gama de cultivares de manzana hay una sugerencia de que los niveles de poligalacturonasa se correlacionan con la firmeza de la fruta independientemente de la tasa de producción de etileno (Wakasa 2006).

EJEMPLO 2: Producción de plantas con expresión reducida de MdPG1

Se crearon diez líneas transgénicas 'Royal Gala' que contenían MdPG1 expresado en una orientación antisentido conducida por un promotor constitutivo fuerte (promotor 35S). El clon de ADNc de poligalacturonasa específico de la fruta MdPG1 (anteriormente GDPG1, Atkinson 1994) se clonó en pART7 como se describe previamente (Atkinson et al. 2002). Un clon con el gen de PG en la orientación antisentido se dirigió con *NotI* y se clonó en el vector binario pART27. El binario se electroporó en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. Se produjeron brotes de 'Royal Gala' de manzana transgénica usando el método de Yao et al. (1995) y se mantuvieron en un invernadero de contención bajo condiciones idénticas (luz y temperatura ambiente) dando plantas no mutantes. Las plantas se transfirieron a neveras durante 8-10 semanas cada año para cumplir los requisitos de frío del invierno. Las flores se polinizaron a mano cada primavera y la fruta se recogió en otoño cuando pudieron detectarse los volátiles del aroma.

EJEMPLO 3: La fruta de plantas producidas por los métodos de la invención muestra ablandamiento reducido durante el almacenamiento poscosecha

Cinco líneas, de las 10 descritas en el Ejemplo 2, mostraron menos ablandamiento que el control no mutante después de dos semanas a temperatura ambiente (Figura 2) y 2 líneas (PG275 y PG41) mostraron significativamente menos ablandamiento después de 16 semanas a 5 °C de almacenamiento. Esto se correlacionó con los experimentos previos en los que las manzanas de la línea PG41 mostraron ablandamiento mucho más reducido en comparación con las manzanas de control. La disminución del ablandamiento en esta línea se ha mostrado para fruta recogida a lo largo de 3 estaciones de cultivo (Tabla 1).

Se midió la firmeza usando una prueba de perforación según la práctica de la industria estándar (Blanpied et al., 1978). Esto implicó la eliminación localizada de la piel de dos localizaciones opuestas sobre el ecuador de la fruta, y registrando la fuerza máxima mientras que se conducía una sonda cilíndrica de 7,9 mm en la corteza externa a una profundidad constante (8 mm) a una velocidad fija (4 mm/s). La prueba de perforación y la captura de datos se realizó usando un Stable Micro Systems TA-XT plus Texture Analyser (Hertog et al 2001).

Tabla 1: Firmeza en PG41 frente a manzanas de control a lo largo de 3 años

| Sonda (mm) | 2005       |                                 | 2007       |                                 | 2008        |                                 |
|------------|------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|-------------|---------------------------------|
|            | Recogida   | Almacenamiento 30 semanas, 5 °C | Recogida   | Almacenamiento 32 semanas, 5 °C | Recogida    | Almacenamiento 16 semanas, 5 °C |
|            | 11 firmeza | 11 firmeza                      | 11 firmeza | 11 firmeza                      | 8,5 firmeza | 8,5 firmeza                     |
| PGA41      | sin datos  | 6,18                            | 9,25       | 7,0                             | 5,06        | 3,50                            |
| control    | sin datos  | 2,83                            | 4,7        | 4,0                             | 4,64        | 2,49                            |

Es una característica deseable fruta más firme, ya que los ensayos sensoriales/del consumidor muestran que los consumidores prefieren fruta más firme.

EJEMPLO 4: Los niveles de proteína MdPG1 se correlacionan con la tasa de ablandamiento

Se amplificó el ORF maduro de MdPG1 por PCR usando los cebadores RA136 5'-ACGGGATCCG CTCCGGCCAA AACCATTAGC-3' y RA137 5'-ATAGTTTATC GGCCGCTTAA CATCTAGGGG AGACAAC-3'. La inserción se escindió con *Bam*HI y *Not*I (subrayado en los cebadores) y se ligó en sitios correspondientes del vector pET-30a(+) (Novagen, Madison, WI, EE.UU.). pETMdPG1 se transformó en células BL21 que contenían el plásmido pLysS y proteína marcada con His recombinante purificada por cromatografía de afinidad por Ni bajo condiciones desnaturizantes (Schröder et al. 1998). Se usaron formas recombinantes purificadas de la proteína MdPG1 cortadas de un gel de poliacrilamida para producir un anticuerpo policlonal en conejos.

Los niveles de proteína MdPG1 se midieron en transferencias Western usando anticuerpos policlonales producidos para la proteína MdPG1 madura. Para cada línea transgénica, descrita en el Ejemplo 3 anteriormente, la proteína se extrajo de manzanas en la cosecha, después de dos semanas de almacenamiento a temperatura ambiente y después de 16 semanas de almacenamiento en frío. En la cosecha no se detectó MdPG1 en ninguna de las manzanas, excepto la línea PG290 (Figura 3). Después de 2 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente (TA) se encontró que ambas líneas 'Royal Gala' y PG290 mostraron un nivel significativo de PG. Las líneas PG7, PG8, PG17 y PG164 tuvieron un nivel detectable de PG (Figura 4). Después de 4 semanas de almacenamiento en frío, las líneas PG7, PG8, PG30 y PG164 tuvieron un nivel detectable de PG (no se ensayaron las líneas 213B, PG275 y PG290) (Figura 5). A las 16 semanas de almacenamiento, las líneas, excepto PG41 y PG275, mostraron

niveles significativos de PG (Figura 6). En la comparación a través de los momentos de tiempo hubo una fuerte correlación de niveles de PG y tasa de ablandamiento. Las líneas PG30 y PG40 mostraron poco ablandamiento a las 2 semanas a TA y mostraron niveles muy bajos de PG en este momento. PG41 mostró PG no detectable y PG275 mostró niveles muy bajos de PG, ambas de las cuales fueron las manzanas más firmes después de 16 semanas de almacenamiento (Figura 7).

EJEMPLO 5: La fruta de plantas producida por los métodos de la invención muestra pérdida de agua reducida durante el almacenamiento poscosecha

Manzanas de 8 líneas transformantes independientes, junto con las manzanas de control 'Royal Gala', se dejaron a temperatura ambiente durante 1 mes tras un periodo de almacenamiento de 16 semanas a 4 grados, y se pesaron cada dos semanas. Se encontró que las líneas PG41 y PG275 mostraron una tasa de pérdida de agua más baja (0,00273 y 0,00237 g/día/g de PF, respectivamente) en comparación con el control sin transformar (0,0046 g/día/g de PF). Las otras líneas transgénicas mostraron un intervalo entre 0,00299 y 0,00317 g/día/g de PF (Figura 8). Estos números fueron mucho mayores que aquellos encontrados en el experimento de pérdida de agua separado con manzanas antisentido ACO mutantes no en maduración y líneas 'Royal Gala' que no se habían guardado en frío (Figura 8), sugiriendo que el almacenamiento en frío de las manzanas puede acelerar adicionalmente la pérdida de agua. Las manzanas de las líneas PG41 y PG275 también mostraron menos arrugamiento en comparación con 5 semanas a TA después de la transferencia de 16 semanas de almacenamiento en frío (Figura 9).

EJEMPLO 6: La fruta de plantas producida por los métodos de la invención muestra elevada jugosidad durante el almacenamiento poscosecha

#### *Análisis microscópico de líneas PG41 y controles sin transformar*

El seccionamiento de células de manzanas Royal Gala tras un periodo de almacenamiento en frío de 16 semanas reveló que la adhesión célula a célula estaba significativamente debilitada (con supuestamente unión de pectina entre las células que muestran regiones claras que se han separado, Figura 10A). Las secciones de células en las líneas PG41 no muestran separación (Figura 10B). Adicionalmente, la tinción de anticuerpos de las líneas PG41 mostró un mantenimiento de los homogalacturanos desmetilados en esquinas de las células (Figura 11) en comparación con el control 'Royal Gala', que son elegidos como diana por PG (identificadas usando un anticuerpo JIM5). Esto sugiere que la disminución del nivel de PG reduce la rotura de células entre los límites celulares en vez de a través de las células. Se ha propuesto que la diferencia entre manzanas jugosas y manzanas harinosas es debido a la forma en la que las células se rompen durante una acción de morder. Hallett et al. han mostrado que la jugosidad no es una medida del contenido de agua, ya que las manzanas harinosas y jugosas contienen la misma cantidad de agua. Se ha sugerido que las manzanas jugosas se rompen a través de células que liberan el zumo, mientras que las manzanas harinosas se rompen entre células dando una sensación en la boca mucho más seca. La pérdida de adhesión célula a célula en las líneas de control sugiere que las manzanas tendrían una textura más harinosa, y las manzanas PG41 serían más jugosas (esto no puede confirmarse debido a restricciones en la ingestión de manzanas transgénicas en este país). De estos resultados se prevé que las manzanas inactivadas para PG también serán más crujientes y más crocantes que los controles 'Royal gala'. Cuando se cortan las manzanas después del almacenamiento parecieron mantener su capacidad de crujir.

EJEMPLO 7: La fruta de plantas producida por los métodos de la invención muestra composición de cera alterada

Las líneas PG17 y PG275 antisentido de PG tuvieron ambas una sensación cerosa en comparación con el control Royal Gala, proporcionando evidencia de que la expresión alterada en el método de la invención puede producir producción de cera alterada.

EJEMPLO 8: La fruta de plantas producida por los métodos de la invención muestra podredumbres/infecciones en el almacenamiento poscosecha reducidas

Se sometió fruta de control a infección por patógenos poscosecha después de almacenamiento a largo plazo a 5 °C. A diferencia, las líneas PG41 raramente mostraron infección. Este efecto puede ser debido a una reducción en las microfisuras sobre la superficie de la fruta que proporcionan un punto de entrada para la invasión de patógenos.

#### *Almacenamiento de la fruta a 5 °C*

El almacenamiento de la fruta comercial se lleva a cabo a 1 °C en condiciones de atmósfera controlada/modificada. Manzanas PG41 en este estudio se almacenaron a condiciones inferiores a las óptimas y todavía mantuvieron la calidad de la fruta. Esto puede permitir que la fruta se guarde a temperaturas ligeramente mayores, reduciendo así los costes.

EJEMPLO 9: La fruta de plantas producida por los métodos de la invención muestra atributos de maduración principalmente normales

*Manzanas PG41 muestran atributos de maduración normales*

Para evaluar si se alteró cualquier otro atributo de maduración en el mutante PG41 que pudiera contribuir al fenotipo, se midieron etilenos internos, índice patrón de almidón (SPI) y contenido de sólidos solubles (SSC) en la cosecha, y el etileno se midió 16 semanas después del almacenamiento en frío. A partir del SPI, las manzanas Royal Gala parecieron ser ligeramente más maduras que las líneas inactivadas para PG en la cosecha, pero después de 16 semanas de almacenamiento en frío las líneas PG41 y los controles Royal Gala estuvieron produciendo cantidades similares de etileno (Figura 12), sugiriendo que el reducido ablandamiento no es debido a los reducidos niveles de etileno.

EJEMPLO 10: Identificación de variantes de MdPG1

Se usó la secuencia de MdPG1 para identificar genes de PG ortólogos de bases de datos de secuencias registradas de HortResearch.

Se identificaron dos secuencias de variante como se resume en la tabla a continuación.

| Poligalacturonasa | Especie de Malus | SEQ ID NO de polinucleótidos: | SEQ ID NO de polipéptidos: |
|-------------------|------------------|-------------------------------|----------------------------|
| MsPG1             | <i>sieboldii</i> | 6                             | 2                          |
| MsPG2             | <i>sieboldii</i> | 7                             | 3                          |

La tabla a continuación muestra el % de identidad entre MdPG1 y las secuencias de polipéptidos de variante.

|       | MdPG1 | MsPG1 | MsPG2            |
|-------|-------|-------|------------------|
| MdPG1 | 100 % | 92,3  | 95,2             |
| MsPG1 |       | 100 % | Sin solapamiento |
| MsPG2 |       |       | 100 %            |

La función de estas variantes puede confirmarse usando los métodos descritos en los ejemplos anteriormente.

EJEMPLO 11: La fruta de plantas producida por los métodos de la invención muestra elevada resistencia a la tracción y firmeza en condiciones de almacenamiento comerciales

Se recogieron 30 frutas de las líneas PG41 que tuvieron endopoligalacturonasa 1 de maduración de fruta no detectable junto con 30 controles Royal Gala (RG) sin transformar. Se quitó 1 mm de piel de 15 frutas en 4 cuadrantes en la región ecuatorial de la manzana y se midieron en la cosecha de cada línea para la firmeza de perforación (con 4 tamaños de sonda diferentes) (Tabla 1a) usando un analizador de textura TA.XT (Stable Micro Systems, Ltd, RU) como se describe en Johnston et al (2009). Se tomaron los núcleos del tejido de corteza y se midió la resistencia a la tracción de éstos usando el analizador de textura TA.XT.

Se almacenaron 15 manzanas de cada línea a 0,5 °C durante 10 semanas bajo condiciones de almacenamiento comerciales. Tras este tiempo, las manzanas se probaron otra vez para la resistencia a la tracción y la firmeza de perforación de la carne. Adicionalmente, estas muestras también se evaluaron para la cantidad de zumo liberado por un exprimidor comercial para evaluar los niveles de jugosidad.

Tabla 1. Resultados de resistencia a la tracción y firmeza

| Datos                                     | Tiempo de almacenamiento (semanas) | Valores absolutos |            | % de cambio durante el almacenamiento |       |
|-------------------------------------------|------------------------------------|-------------------|------------|---------------------------------------|-------|
|                                           |                                    | Control           | PG41       | Control                               | PG41  |
| Promedio de máx. fuerza a la tracción (N) | 0                                  | 13,1 ± 1,0        | 12,5 ± 0,6 | 51,40                                 | 34,26 |
|                                           | 10                                 | 6,3 ± 0,7         | 8,2 ± 1,0  |                                       |       |
| Promedio de la fuerza 11 mm Sonda (N)     | 0                                  | 84,4 ± 2,2        | 78,6 ± 3,3 | 30,94                                 | 16,91 |
|                                           | 10                                 | 58,3 ± 1,4        | 65,3 ± 2,4 |                                       |       |
| Promedio de la fuerza 8 mm Sonda (N)      | 0                                  | 45,8 ± 1,5        | 44,3 ± 2,0 | 33,08                                 | 23,70 |
|                                           | 10                                 | 30,6 ± 0,6        | 33,8 ± 1,0 |                                       |       |
| Promedio de la fuerza 5 mm Sonda (N)      | 0                                  | 18,7 ± 0,6        | 18,9 ± 0,8 | 28,37                                 | 22,73 |
|                                           | 10                                 | 13,4 ± 0,3        | 14,6 ± 0,5 |                                       |       |
| Promedio de la fuerza 2 mm Sonda (N)      | 0                                  | 4,1 ± 0,2         | 4,2 ± 0,2  | 34,97                                 | 28,20 |
|                                           | 10                                 | 2,7 ± 0           | 3,0 ± 0    |                                       |       |

No hubo claras diferencias entre las líneas RG de control y las líneas PG41 en la cosecha. Pero después de 10 semanas de almacenamiento hubo un aumento significativo en tanto la resistencia a la tracción como la firmeza. El aumento de 7 N (65,3 N - 58,3) en la firmeza de manzanas PG41 con respecto a manzanas de control RG medido con la sonda de 11 mm tras el almacenamiento es mayor que la diferencia mínima de 6 N que puede detectar un panel sensorial entrenado (Harker et al 2002), indicando fuertemente que en un ensayo sensorial la fruta PG41 se puntuaría como mejor texturizada que el control de RG después del almacenamiento (Figura 12). Cuando se tiene en cuenta la firmeza original de la fruta PG41, entonces solo hay una pérdida de firmeza del 16 % en comparación con una pérdida de firmeza del 31 % en la fruta de control.

## 10 REFERENCIAS

- Atkinson, R. G. 1994. A cDNA clone for endopolygalacturonase gene from apple. *Plant Physiol.* 195, 1437-1438.
- Atkinson, R. G., Schröder, R., Hallett, I. C., Cohen, D., MacRae, E. A. 2002. Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple trees leads to a range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion. *Plant Physiol.* 129, 122-133.
- Ayub, R., Guis, M., Ben Amor, M., Gillot, L., Roustan, J. P., Latche, A., Bouzayen, M., Pech, J. C. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nat. Biotechnol.* 14, 862-6.
- Blanpied GD, Bramlage WJ, Dewey DH, LaBelle RL, Massey LM, Mattus GE, Stiles WC, Watada AE. 1978. A standardized method for collecting apple pressure test data. *New York's Food and Life Sciences Bulletin*, 74 (August), 3-8.
- Brummell, D. A., Harpster, M. H., Civello, P. M., Palys, J. M., Bennett, A. B., Dunsmuir, P. 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11, 2203-16.
- Cantu, D., Vicente, A. R., Greve, L. C., Dewey, F. M., Bennett, A. B., Labavitch, J. M., Powell, A. L. 2008. The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 859-64.
- Carey, A. T., Smith, D. L., Harrison, E., Bird, C. R., Gross, K. C., Seymour, G. B., Tucker, G. A. 2001. Down-regulation of a ripening-related beta-galactosidase gene (TBG1) in transgenic tomato fruits. *J. Exp. Bot.* 52, 663-668.
- Carrington, C., Greve, L. C., Labavitch, J. M. 1993. Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit (VI. Effect of the Antisense Polygalacturonase Gene on Cell Wall Changes Accompanying Ripening in Transgenic Tomatoes). *Plant Physiol.* 103, 429-434.
- Giovannoni, J. J., DellaPenna, D., Bennett, A. B., Fischer, R. L. 1989. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant Cell* 1, 53-63.
- Hellens, R. P., Allan, A. C., Friel, E. N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M. D., Karunairatnam, S., Gleave, A. P. and Laing, W. A. (2005) Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods* 1, 13
- Hamilton, A. J., Lycett, G. W., Grierson, D. 1990. Antisense Gene That Inhibits Synthesis of the Hormone Ethylene in Transgenic Plants. *Nature* 346,284-287.
- Harker, F.R., Maindonald, J., Murray, S. H., Gunson, F. A., Hallett, I.C. and Walker, S. B. 2002. Sensory interpretation of instrumental measurements 1: texture of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 225-239.
- Hertog MLATM, Nicholson SE, Banks N. 2001. The effect of modified atmospheres on the rate of firmness changes in 'Braeburn' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 23, 175-184.
- Janssen, B. J., Thodey, K., Schaffer, R. J., Alba, R., Balakrishnan, L., Bishop, R., Bowen, J. H., Crowhurst, R. N., Gleave, A. P., Ledger, S., McArtney, S., Pichler, F. B., Snowden, K. C., Ward, S. 2008. Global gene expression analysis of apple fruit development from the floral bud to ripe fruit. *BMC Plant Biol* 8, 16.
- Johnston JW, Gunaseelan K, Pidakala P, Wang M, Schaffer RJ. (2009) Coordination of early and late ripening events in apples is regulated through differential sensitivities to ethylene. *J. Exp. Bot* 60, 2689-2699
- Langenkamper, G., McHale, R., Gardner, R. C., MacRae, E. 1998. Sucrose-phosphate synthase steady-state mRNA increases in ripening kiwifruit. *Plant Mol. Biol.* 36, 857-69.

- Langley, K. R., Martin, A., Stening, R., Murray, A. J., Hobson, G. E., Schuch, W. W., Bird, C. R. 1994. Mechanical and Optical Assessment of the Ripening of Tomato Fruit with Reduced Polygalacturonase Activity. *J. Sci. Food Agric.* 66, 547-554.
- 5 Oeller, P. W., Lu, M. W., Taylor, L. P., Pike, D. A., Theologis, A. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254, 437-9.
- Osteryoung, K. W., Toenjes, K., Hall, B., Winkler, V., Bennett, A. B. 1990. Analysis of tomato polygalacturonase expression in transgenic tobacco. *Plant Cell* 2, 1239-48.
- 10 Powell, A. L., Kalamaki, M. S., Kurien, P. A., Gurrieri, S., Bennett, A. B. 2003. Simultaneous transgenic suppression of LePG and LeExp1 influences fruit texture and juice viscosity in a fresh market tomato variety. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7450-5.
- 15 Schröder, R., Atkinson, R. G., Langenkamper, G., Redgwell, R. J. 1998. Biochemical and molecular characterisation of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwifruit. *Planta* 204, 242-251.
- Redgwell, R. J., Curti, D., Gehin-Delval, C. 2008a. Physicochemical properties of cell wall materials from apple, kiwifruit and tomato. *European Food Research and Technology* 227, 607-618.
- 20 Redgwell, R. J., Curti, D., Gehin-Delval, C. 2008b. Role of pectic polysaccharides in structural integrity of apple cell wall material. *European Food Research and Technology* 227, 1025-1033.
- Redgwell, R. J., Fischer, M., Kendal, E., MacRae, E. A. 1997. Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* 203, 174-181.
- 25 Saladié, M., Rose, J. K. C., Cosgrove, D. J., Catalá, C. 2006. Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action. *Plant J.* 47, 282-295.
- 30 Santiago-Domenech, N., Jimenez-Bemudez, S., Matas, A. J., Rose, J. K., Munoz-Blanco, J., Mercado, J. A., Quesada, M. A. 2008. Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. *J. Exp. Bot.* 59, 2769-79.
- 35 Schaffer, R. J., Friel, E. N., Souleyre, E. J., Bolitho, K., Thodey, K., Ledger, S., Bowen, J. H., Ma, J. H., Nain, B., Cohen, D., Gleave, A. P., Crowhurst, R. N., Janssen, B. J., Yao, J. L., Newcomb, R. D. 2007. A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiol.* 144, 1899-912.
- 40 Schuch, W., Kanczler, J., Robertson, D., Hobson, G., Tucker, G., Grierson, D., Bright, S., Bird, C. 1991. Fruit-Quality Characteristics of Transgenic Tomato Fruit with Altered Polygalacturonase Activity. *HortScience* 26, 1517-1520.
- Smith, C. J., Watson, C. F., Bird, C. R., Ray, J., Schuch, W., Grierson, D. 1990. Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 224, 477-81.
- 45 Turki, M., Mandaron, P., Mache, R., and Falconet, D. 2000. Characterization of a ubiquitous expressed gene family encoding polygalacturonase in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. 2000 Jan 25;242(1-2):427-36.
- 50 Wakasa, Y., Kudo, H., Ishikawa, R., Akada, S., Senda, M., Niizeki, M., Harada, T. 2006. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 193-198.
- Yao, J. L., Cohen, D., Atkinson, R., Richardson, K., Morris, B. 1995. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. *Plant Cell Reports* 14, 407-412.
- 55 van Rensburg, P., van Zyl, W.H., Pretorius I.S. 1994. Expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* endo-beta-1,4-glucanase gene together with the *Erwinia pectate* lyase and polygalacturonase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 27 (1):17-22.

SUMARIO DE SECUENCIAS

60

| SEQ ID NO: | Tipo        | Especie                  | Referencia                                                   |
|------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 1          | polipéptido | <i>Malus domestica</i> x | MdPG1, poligalacturonasa, Número de acceso de GenBank L27743 |
| 2          | polipéptido | <i>Malus sieboldii</i>   | MsPG1, poligalacturonasa                                     |

|   |                |                            |                                                                                                                |
|---|----------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3 | polipéptido    | <i>Malus sieboldii</i>     | MsPG2, poligalacturonasa                                                                                       |
| 4 | polinucleótido | <i>Malus domestica</i> , x | MdPG1, secuencia promotora de poligalacturonasa y parte del primer exón. Número de acceso de GenBank AF031233) |
| 5 | polinucleótido | <i>Malus domestica</i> x   | MdPG1, poligalacturonasa, ADNc                                                                                 |
| 6 | polinucleótido | <i>Malus sieboldii</i>     | MsPG1, poligalacturonasa, ADNc                                                                                 |
| 7 | polinucleótido | <i>Malus sieboldii</i>     | MsPG2, poligalacturonasa, ADNc                                                                                 |

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> THE NEW ZEALAND INSTITUTE FOR PLANT AND FOOD RESEARCH LIMITED

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA AUMENTAR LA VIDA DE ALMACENAMIENTO DE LA FRUTA

<130> 609739 HCF

10 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 460

<212> PRT

<213> Malus x domestica

20 <400> 1

ES 2 588 280 T3

Met Ala Leu Lys Thr Gln Leu Leu Trp Ser Phe Val Val Val Phe Val  
1 5 10 15

Val Ser Phe Ser Thr Thr Ser Cys Ser Gly Ser Ser Phe Gln Glu Val  
20 25 30

Asn Ala Leu His Ser Tyr Val Asp His Val Asp Asp Lys Glu Ser Gly  
35 40 45

Tyr Asn Ser Arg Ala Tyr Pro Ser Tyr Thr Asp Thr Ile Glu Gly Leu  
50 55 60

Lys Val Met Glu Leu Ile Arg Pro Arg Thr Gln Leu Phe Ser Ser Arg  
65 70 75 80

Lys Leu Asn Thr Ile Thr Gly Gly Ile Ala Thr Ser Ser Ala Pro Ala  
85 90

Lys Thr Ile Ser Val Asp Asp Phe Gly Ala Lys Gly Asn Gly Ala Asp  
100 105 110

Asp Thr Gln Ala Phe Val Lys Ala Trp Lys Ala Ala Cys Ser Ser Ser  
115 120 125

Gly Ala Met Val Leu Val Val Pro Gln Lys Asn Tyr Leu Val Arg Pro  
130 135 140

Ile Glu Phe Ser Gly Pro Cys Lys Ser Gln Leu Thr Leu Gln Ile Tyr  
145 150 155 160

Gly Thr Ile Glu Ala Ser Glu Asp Arg Ser Ile Tyr Lys Asp Ile Asp  
165 170 175

His Trp Leu Ile Phe Asp Asn Val Gln Asn Leu Leu Val Val Gly Pro  
180 185 190

ES 2 588 280 T3

Gly Thr Ile Asn Gly Asn Gly Asn Ile Trp Trp Lys Asn Ser Cys Lys  
 195 200 205

Ile Lys Pro Gln Pro Pro Cys Gly Thr Tyr Ala Pro Thr Ala Val Thr  
 210 215 220

Phe Asn Arg Cys Asn Asn Leu Val Val Lys Asn Leu Asn Ile Gln Asp  
 225 230 235 240

Ala Gln Gln Ile His Val Ile Phe Gln Asn Cys Ile Asn Val Gln Ala  
 245 250 255

Ser Cys Leu Thr Val Thr Ala Pro Glu Asp Ser Pro Asn Thr Asp Gly  
 260 265 270

Ile His Val Thr Asn Thr Gln Asn Ile Thr Ile Ser Ser Ser Val Ile  
 275 280 285

Gly Thr Gly Asp Asp Cys Ile Ser Ile Val Ser Gly Ser Gln Arg Val  
 290 295 300

Gln Ala Thr Asp Ile Thr Cys Gly Pro Gly His Gly Ile Ser Ile Gly  
 305 310 315 320

Ser Leu Gly Glu Asp Gly Ser Glu Asp His Val Ser Gly Val Phe Val  
 325 330 335

Asn Gly Ala Lys Leu Ser Gly Thr Ser Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr  
 340 345 350

Trp Lys Gly Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asn Ile Val Phe Gln Asn Val  
 355 360 365

Gln Met Asn Asp Val Thr Asn Pro Ile Ile Ile Asp Gln Asn Tyr Cys  
 370 375 380

Asp His Lys Thr Lys Asp Cys Lys Gln Gln Lys Ser Ala Val Gln Val  
 385 390 400

Lys Asn Val Leu Tyr Gln Asn Ile Arg Gly Thr Ser Ala Ser Gly Asp  
 405 410 415

Ala Ile Thr Leu Asn Cys Ser Gln Ser Val Pro Cys Gln Gly Ile Val  
 420 425 430

Leu Gln Ser Val Gln Leu Gln Asn Gly Arg Ala Glu Cys Asn Asn Val  
 435 440 445

Gln Pro Ala Tyr Lys Gly Val Val Ser Pro Arg Cys  
 450 455 460

<210> 2  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 <213> *Malus sieboldii*

5

<400> 2

ES 2 588 280 T3

Met Ala Leu Lys Thr Gln Leu Leu Trp Ser Phe Val Val Val Phe Val  
1 5 10 15

Val Ser Phe Ser Thr Thr Ser Cys Ser Gly Ser Ser Phe Gln Glu Val  
20 25 30

Asn Ala Leu His Ser Tyr Val Asp His Val Asp Asp Lys Glu Ser Gly  
35 40 45

Cys Asn Ser Arg Thr Tyr Pro Ser Tyr Thr Asp Thr Ile Ile Glu Gly  
50 55 60

Leu Lys Phe Met Glu Leu Ile Arg Pro Ile Thr Gln Leu Phe Ser Ser  
65 70 75 80

Arg Lys His Asn Thr Ile Thr Gly Gly Ile Ala Thr Ser Ser Ala Arg  
85 90 95

Ala Lys Thr Ile Ser Val Asp Asp Phe Gly Ala Lys Gly Asp Gly Ala  
100 105 110

Asp Asp Thr Gln Ala Phe Glu Lys Ala Trp Lys Ala Ala Cys Ser Ser  
115 120 125

Ser Gly Ala Met Val Leu Val Val Pro Gln Lys Asn Tyr Leu Val Gly  
130 135 140

Pro Ile Glu Phe Ser Gly Pro Cys Lys Ser Arg Leu Thr Leu Gln Ile  
145 150 155 160

Tyr Gly Thr Ile Glu Ala Ser Glu Asp Arg Ser Ile Tyr Lys Asp Thr  
165 170 175

Asp His Trp Leu Ile Phe Asp Asn Val Gln Asn Leu Val Val Val Gly  
180 185 190

Pro Gly Thr Ile Asn Gly Asn Gly Asn Ile Trp Trp Lys Asn Ser Cys  
195 200 205

Lys Ile Lys Pro Gln Pro Pro Cys Asp Thr Tyr Ala Pro Met Ala Val  
210 215 220

Thr Phe Asp Lys Cys Asn Asn Leu Val Val Lys Asn Leu Asn Ile Arg  
225 230 235 240

Asp Ala Gln Gln Met His Val

245

5 <210> 3  
<211> 187  
<212> PRT  
<213> *Malus sieboldii*  
<400> 3

ES 2 588 280 T3

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

5 <210> 4  
 <211> 2839  
 <212> ADN  
 <213> *Malus x domestica*

10 <400> 4

ES 2 588 280 T3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gaattcaaaa aaactatttg gaccattccg agcaagtcta tctaaatagc aatagcatca  | 60   |
| ctctatatta ttgcagttct tattaagagt gtgtataata ttgtacttgt atccaaaaca  | 120  |
| acaatcctgg ctatTTTTAC atattcaata taaagttcca atacgatcac tgattgatta  | 180  |
| attggtatca agtacaatac ttctgcatct ctcttaaaaa acatcaacaa tgcattacgt  | 240  |
| gttgtagatt gttatcagag tcggccctgg cccagtgctca ccagggcgac cgcttgaggt | 300  |
| ccaaaaaac gagtggcacc aaaaaaaaaat taagttgggt catatatgta taaggttttg  | 360  |
| ttttattctt gatatatagt aaacgctcat attaaatagc aatatgtttt agatgacagg  | 420  |
| gtggTTTTat ttggTTTTc cgtgcccacc taggtttaat tccctctctc aacataaagg   | 480  |
| ggtagtttcc cttctatttt attcatgtct actttaaata acaaacaac attaattagc   | 540  |
| ttattaaatg tggcattttc agtagtctgt ttttgTTTTc agtttgaatt aactcgcaa   | 600  |
| atcatgttca agtttgtcta aatataaatt taggtTTTTt atatttgttg ataactttt   | 660  |
| catggttaag taataaactt gtgatcatta tctttttatt gaacgaagta ttggtgacaa  | 720  |
| tccaaaaata tcacctaca cttctttgta taattTTTTc cttatgattt tatatatttg   | 780  |
| gaatgaaccg caacttttca tgagcgctcg aaaaacaaaa acatagttga attactatgt  | 840  |
| gccctttggg agtagcaatt tgttgttttc atttgttgct tacatataga aattagagat  | 900  |
| cttaaatatg aaaaattcat ttcaaaagtt tcataatgtg caagtagctt gtagatcagt  | 960  |
| tagttaaaag tgttcagctt gtcactcaat gactcgtttt caaatttctt caccgtattt  | 1020 |
| ctgatgagtt tagtgtaaat taccctatca tttgtcaaaa aagtcataat gtgaaaaagg  | 1080 |
| tctattttct ttaatattca atgtacaaca tacaaatact aagataaata attattttat  | 1140 |
| gtgaagttat gttagggcat atttttcaat gtcgcctagg gcctcataaa actcaggata  | 1200 |
| ggccttgatt gttatatatg gtactaaaca aaagtttcca aaatacaaag tttaaaaaga  | 1260 |
| ttcaagtgga attttgaaga attttaaaag tattataaat tttgataacc cctcgagttg  | 1320 |
| attaattgcg ggggatgtgg tcatcatgac cgctatggta gttcatggag caacctactt  | 1380 |
| gttccccac ttatgattga cgcattttta ctgtatgaac atcataatca gaaccgttcg   | 1440 |
| ttctctttgt catcatcgaa agatcatata tgcaaaaact cattaaattg agagattttt  | 1500 |
| ttagccattc atatgtatca tacaaataga cggttcatca taaggatgct acttgttacc  | 1560 |
| aaaaacattg attggtttga catatatgga tgggtaaaaca atctccaaat ggaatatttt | 1620 |
| ttttagatat gatatttcga tgatgataaa gagaatgaac gggtaaata ataatgttca   | 1680 |
| tatggtgaag atgcgtaaat cataagtga gggacaagtt ggttccctat ggaggacaca   | 1740 |
| agcattattc gtttttaggt gtattcaatt agaattgtaa atgaatctat aaaagttcag  | 1800 |
| gaatattcag tcagaatggt aaacaagctt atagaactcc atacaaattc aggtgtatta  | 1860 |
| atcaattaa attttaaaagg attttataaa agtcaacaga aatctgagtg tattcaaaaga | 1920 |
| agattttgaa aaagtctaag aaagttagag tgtattgatc agtaataatt tgattttaaa  | 1980 |
| gaattttaaa atgatacatt ttagtaaatt tgaaggaatt tcatagagta tttaacctt   | 2040 |
| aataaatcat acttctgtaa agtccattaa aaaactccat caactttcat aaattgaaac  | 2100 |
| atttttaaat ccataaaagt tgaaccgaat ctattttcat atattatttt atacatgcaa  | 2160 |

ES 2 588 280 T3

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| cgacttacgt tgtaacataa gggatgcaat gcatggcgca gaaagtcata gagtcggcaa | 2220 |
| agacatcatt tcgtctgaat ctctcatgtc cgagaacca tacctcaaga gcccaagacg  | 2280 |
| acacaataca caacaatcac cgtcaatacc cttctcttcc gctgcctata aataccaatg | 2340 |
| gaaatcccac gacattctca ccaaatcatc atcaattgaa cacaccaatc cttacacttc | 2400 |
| tagctacaat tctaagtttc cattttccaa catcccatca cattgttcaa aaatatcatc | 2460 |
| agcctcgagt tagggtttat taccctcgt gaccctcctt ttagtatttg gttctttttg  | 2520 |
| aaagacgatt tgtaggtgt ttctaggcct ctagccatct tgtatctcac caaaaaaaaa  | 2580 |
| tatattacca gctgtttaca ccaaattaa tagtaaaaag aaagcatcaa tggctttaa   | 2640 |
| aacacagttg ttgtggcat ttgttgtgt ttttgttgt tccttcagta caacttcatg    | 2700 |
| ttctggtagt agtttccagg aggtcaacgc gtttcatagt tacgttgacc atgttgatga | 2760 |
| taaagagtcc ggctataatt ctagggtta tccttcatac acggacacca tagaaggttt  | 2820 |
| aaaggatg gaattgatc                                                | 2839 |

<210> 5  
 <211> 1773  
 <212> ADN  
 <213> *Malus x domestica*  
  
 <400> 5

5

ES 2 588 280 T3

aaccttacac ttcttctaca attctaagtt tccatthttcc aacatcccat cacattgttc 60  
 aaaaatatca tcagcctcga gttagggttt attatccttc gtgaccctcc ttttagtatt 120  
 tggttctttt tgaaagacga tttgttaggt gtttctaggc ctctagccat cttgtatctc 180  
 accaaaaaaa aatatattac cagctgttta caccaatta aatagtaaaa agaaagcattc 240  
 aatggcttta aaaacacagt tgttggtggtc atttgttggt gtttttgttg tttccttcag 300  
 tacaacttca tgttctggtg gtagtttcca ggagggtcaac gcgcttcata gttacgttga 360  
 ccatgttgat gataaagagt ccggtataa ttctagggtc tatccttcac acacggacac 420  
 catagaaggt ttaaagggtca tggattgat caggccaaga actcagctct tcagttcaag 480  
 gaagctcaac acaatcaccg gtgggatagc aacatcatca gtcctggcca aaaccattag 540  
 cgctgacgat tttggagcta aagggaatgg tgctgatgac acacaggcat ttgtgaaggc 600  
 atggaaggca gcttgttctt ccagtggagc tatggttctt gtggtaccac agaagaacta 660  
 tcttgtttagg ccgattgaat tctcaggccc atgcaaatct caacttacac tgcagattta 720  
 tggaaaccata gaagcatcag aagaccgatc aatctacaaa gacatagacc actggctcat 780  
 ctttgacaat gtccaaaact tgctagtgtg tggctctgga accatcaatg gcaatggaaa 840  
 catctggtgg aaaaactcat gaaaataaaa acctcagccc ccttgcggtg catacgcccc 900  
 cacggctgtg accttcaaca ggtgcaataa cttggtggtg aagaatctga atatccaaga 960  
 cgcaacaaca atccatgtca tattccaaaa ctgcatcaac gttcaagctt cctgtctcac 1020  
 ggtaactgca ccagaggaca gccctaatac ggacggaatt catgtgacaa ataccagaa 1080  
 catcactatc tcgagctcgg ttataggaac aggtgatgac tgtatttcta ttgtgagtgg 1140  
  
 gtcccaaaga gttcaagcca cagacattac ttgtggacca ggccatggaa tcagtattgg 1200  
 tagcttggga gaagacggct cagaagatca tgtttcagga gtatttgtga atggagctaa 1260  
 gctttcagga acctccaatg gactccggat caagacgtgg aagggaggct caggcagtgc 1320  
 aaccaacatt gttttcaga atgtgcaaat gaacgatgtc accaacccca tcatcatcga 1380  
 ccagaactac tgtgaccaca aaaccaaaga ttgcaaaaaa cagaaatcgg cgggtccaagt 1440  
 gaaaaatgtg ttgtaccaaa acataagagg aacgagtgct tccggcgacg cgataacggt 1500  
 gaactgcagc caaagtgttc cttgtcaggg gatcgtgctg caaagtgttc aactgcagaa 1560  
 tggagagct gaatgcaaca atgttcagcc tgcttacaaa ggagttgtct cccctagatg 1620  
 ttaaaacctg gggttcataa ttatgggcat tgtgaaatag attatgcaat tcttgtacca 1680  
 attagcacat aaataattgt ttgtttgtaa ttttatggt taatttggca ttgtacataa 1740  
 acatattcat aaataaaaag atgcaacttt tat 1773

<210> 6  
 <211> 958  
 <212> ADN  
 <213> *Malus sieboldii*

5

<400> 6

ES 2 588 280 T3

atcacttgaa cacaccaatc cttgcaactg tagctacaat tctaagtttc cattttccaa 60  
 cateccatca cattgttcaa aaatatcatc agcctcgagt tagggtttat tatecttcgt 120  
 gaccctcttt ttagtatttg gttctttttg tatctacca aaagaaaata tattaccagc 180  
 tgtttacacc aaattaaata gtaaaaagaa agcatcaatg gctttaaaaa cacagttggt 240  
 gtggtcattt gttgtggttt ttggtgtttc cttcagtaca acttcatggt ctggtagtag 300  
 tttccaggag gtcaacgcgc ttcatagta cgttgacat gttgatgata aagagtcgg 360  
 ctgtaattct aggacttacc cttcatacac ggacaccatt attgaagggt taaagttcat 420  
 ggaattgatc aggccaataa ctcagctctt cagttcaagg aagcacaaca caatcaccgg 480  
 tgggatagca acatcatcag ctcgggccaa aaccattagc gtcgacgatt ttggagctaa 540  
 aggggatggt gctgatgaca cacaggcatt tgagaaggca tggaaaggcag cttgttcttc 600  
 cagtgagct atggttcttg tggtagcga gaagaactat cttgttgggc caattgaatt 660  
 ctcaggccca tgcaaatctc gacttacct gcagatttat ggaaccatag aagcatcaga 720  
 agaccgatca atctacaaag acacagacca ctggctcatc ttgacaatg tccaaaactt 780  
 ggtagtgtt ggtcctggaa caatcaatgg caatggaaac atctggtgga aaaactcatg 840  
 caaataaaaa cctcagcccc cttgcgatac atacgcccc atggctgtaa ccttcgacaa 900  
 gtgcaataac ttggtggtga agaactgaa tatccgagac gcacaacaaa tgcattgc 958

<210> 7  
 <211> 653  
 <212> ADN  
 <213> *Malus sieboldii*

5

<400> 7

tcatgtgtca aatacccaga atactactat ctccagctcc gttataggaa caggtgatga 60  
 ctgtatttct attgtgagtg ggtcccaaag agttcaagcc acagacatta cttgtggacc 120  
 aggccatgga atcagtattg gtagcttggg agaagacggc tcaaaagatc atgtttcagg 180  
 agtatttgtg aatggagcta agctttcagg aacctccaat ggactccgga tcaagacgtg 240  
 ggagggaggc tcaggcagtg caaccaacat tgttttcag aatgtgcaaa tgaacgatgt 300  
 cgccaacccc atcatcatcg accagaacta ccgtgaccac aaaaccaaag attgcaaaca 360  
 acagaaatcg gcggttcaag tgaaaaatgt gttgtacaaa aacataagag gaacgagtg 420  
 ttcccgcgac gcgataacgt tgaactgcag cccaagtgtt ccttgtcagg ggatcgtgct 480  
 gcaaagtgtt caactgcaga atggaagagc tgaatgcaac aatgttaagc ctgcttacia 540  
 aggagttgtc tcccctagat gttaaaacct agggctcata attatgggca atgtgaaaca 600  
 gcttatgcaa ttctgtgacg aattagcaca taaataattg ttgtttgta ata 653

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para aumentar la vida de almacenamiento poscosecha y firmeza de la fruta de una planta de una especie Rosaceae durante, o después, del almacenamiento poscosecha, con respecto a la fruta de una planta de control bajo las mismas condiciones, comprendiendo el método reducir la expresión o actividad en la planta de un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una variante del polipéptido con al menos el 70 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a lo largo de la longitud entera de SEQ ID NO: 1, en el que el método comprende la etapa de introducir un polinucleótido en una célula de planta, o planta, para efectuar la reducción de la expresión del polipéptido o variante, en el que el polinucleótido comprende al menos uno de:
- 10 i) una secuencia con al menos el 70 % de identidad con parte de un gen endógeno, o ácido nucleico, que codifica el polipéptido o variante del mismo, y  
ii) una secuencia que se hibrida bajo condiciones rigurosas con parte de un gen endógeno, o ácido nucleico, que codifica el polipéptido o variante del mismo, en el que la variante tiene actividad de poligalacturonasa.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la fruta también tiene al menos uno de:
- a) pérdida de agua reducida,  
20 b) separación de células reducida,  
c) elevada jugosidad,  
d) elevada capacidad de crujir,  
e) elevada cerosidad, y  
f) reducida susceptibilidad a patógenos necrofíticos,
- 25 durante, o después, del almacenamiento poscosecha, con respecto a la fruta de una planta de control bajo las mismas condiciones.
- 30 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el polinucleótido se introduce en la planta como parte de una construcción genética.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polinucleótido se introduce en la planta como parte de una construcción de expresión que comprende un promotor operativamente ligado al polinucleótido.
- 35 5. El método de la reivindicación 4, en el que el polinucleótido está en una orientación antisentido con respecto al promotor.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la planta es del género *Malus*.
- 40 7. El método de la reivindicación 6, en el que la planta es *Malus domestica*.

Figura 1

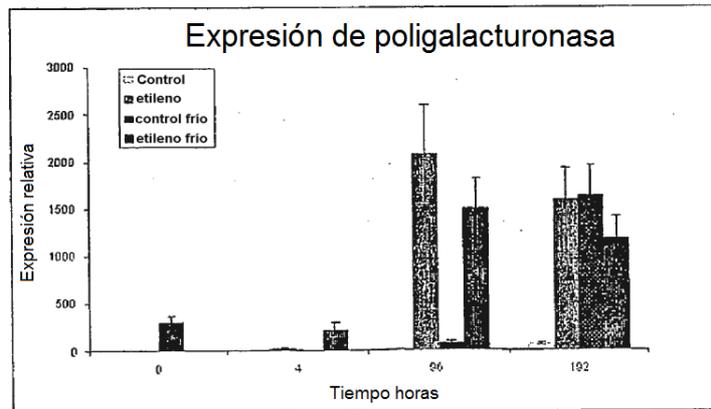
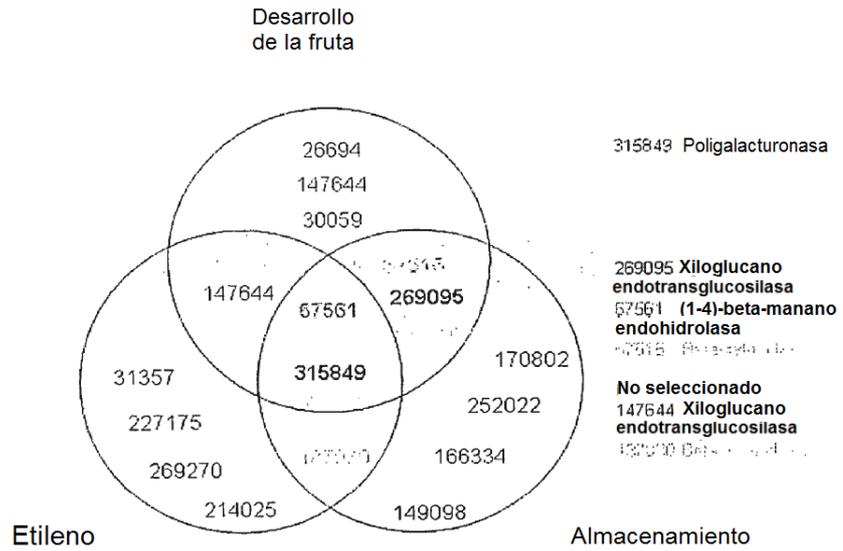


Figura 2

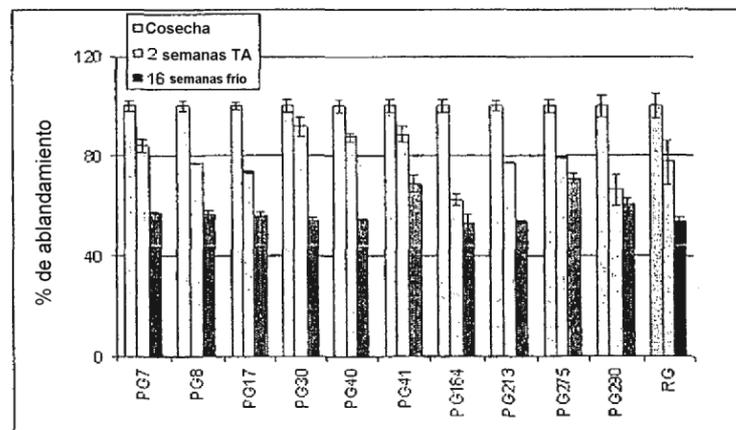
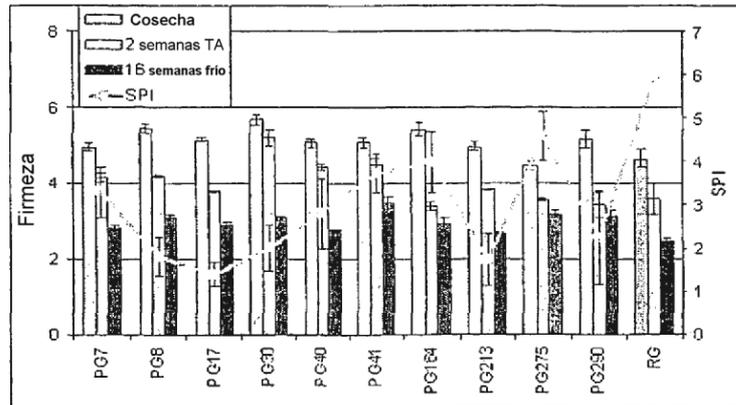


Figura 3

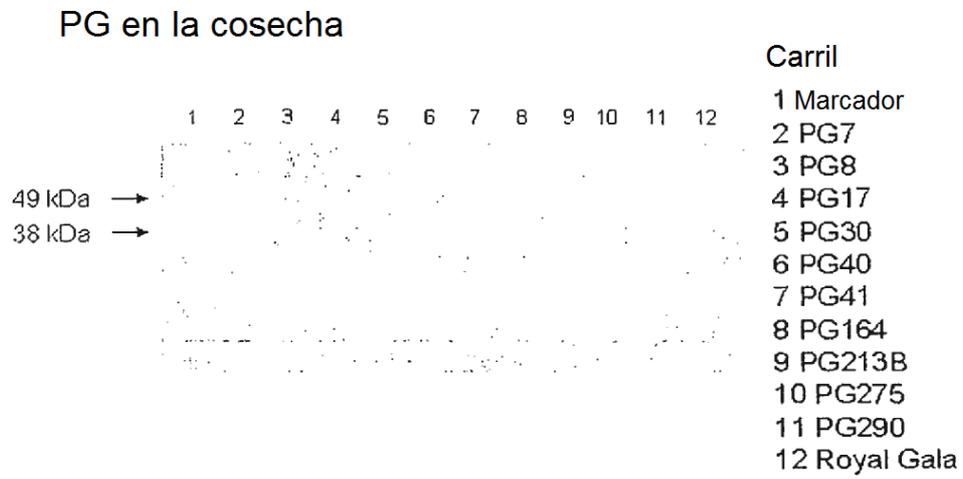


Figura 4

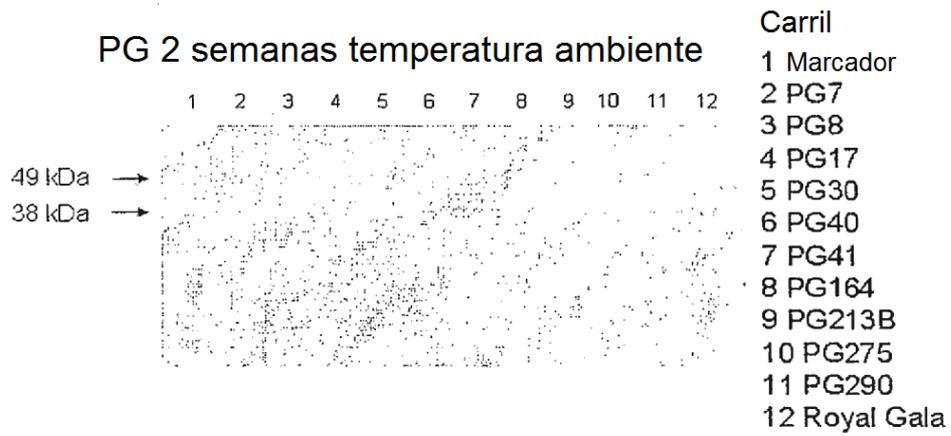


Figura 5

PG 4 semanas tratamiento en frío

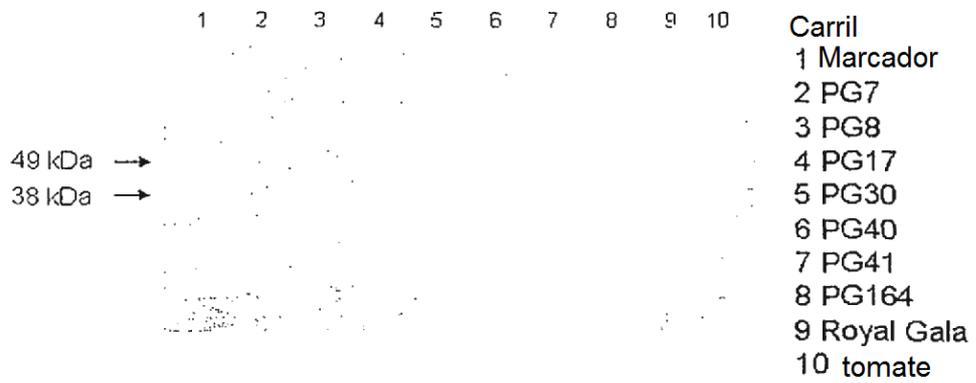


Figura 6

PG 16 semanas tratamiento en frío

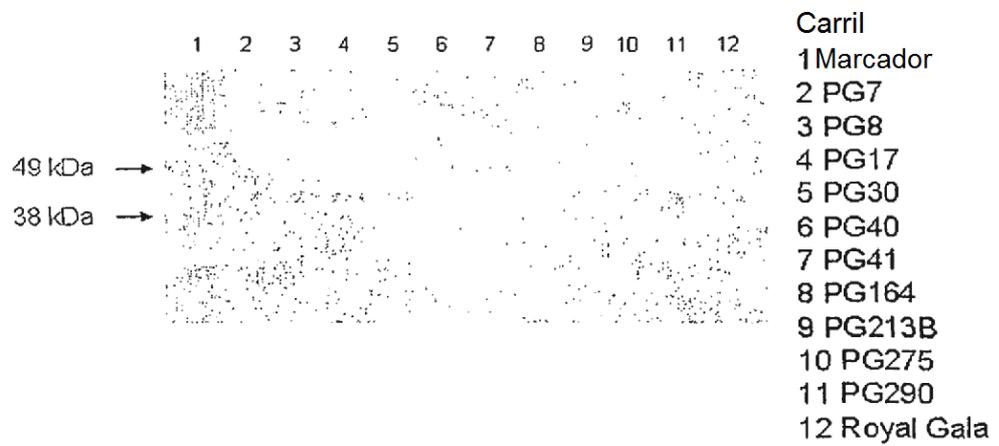


Figura 7

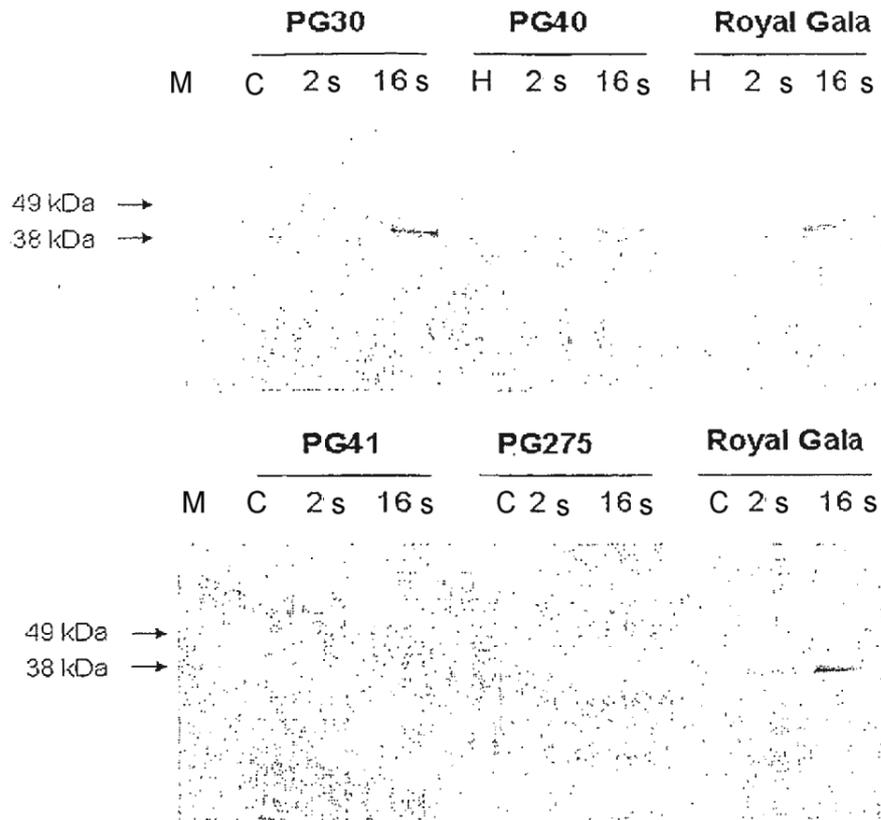
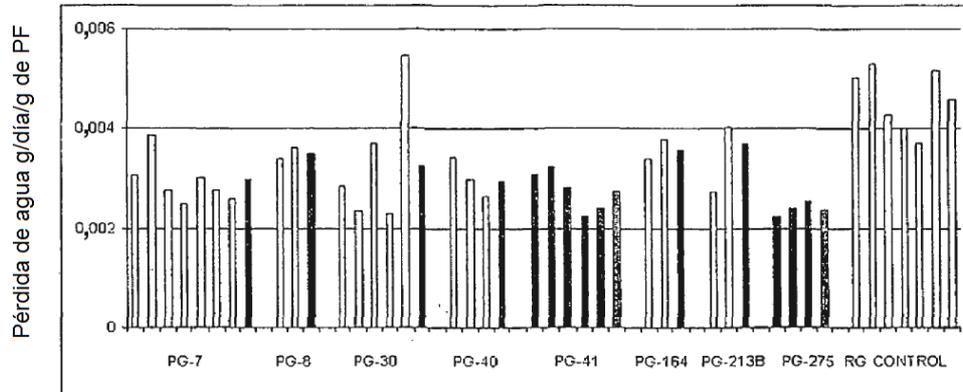


Figura 8

Pérdida de agua de la inactivación de PG y Royal Gala después de almacenamiento en frío



Pérdida de agua de la inactivación de ACO y Royal Gala del árbol

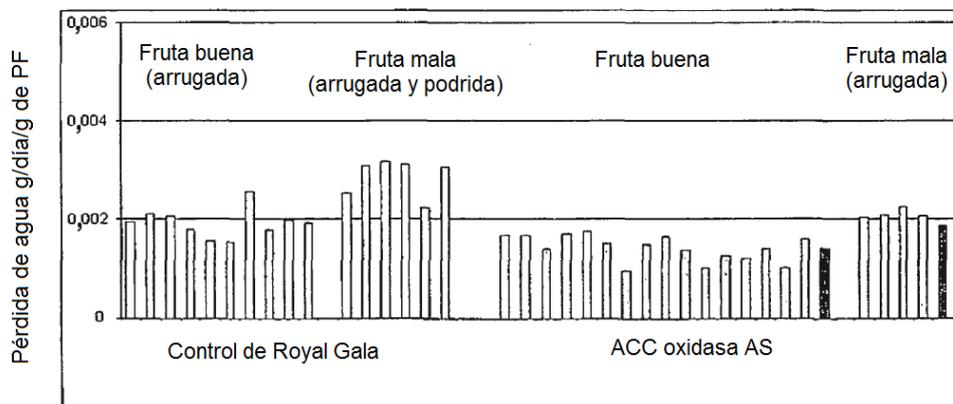
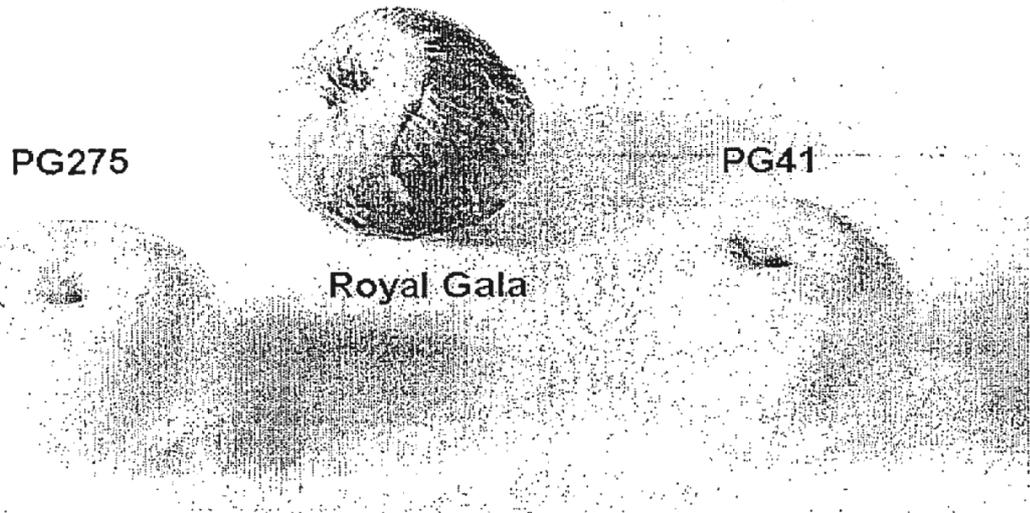


Figura 9



16 semanas de almacenamiento en frío seguido de 5 semanas a TA

Figura 10

Royal Gala 16 semanas de almacenamiento en frío



PG41 16 semanas de almacenamiento en frío

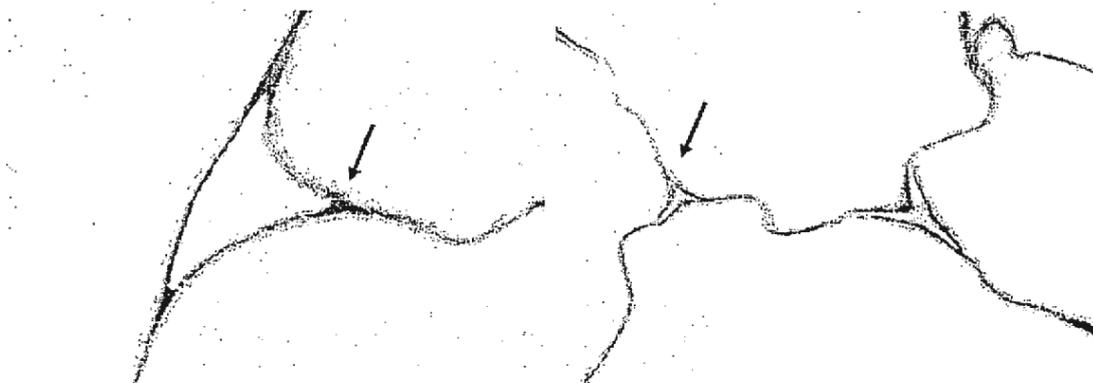
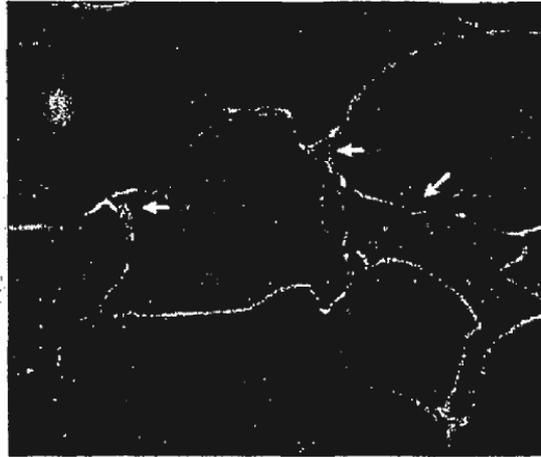
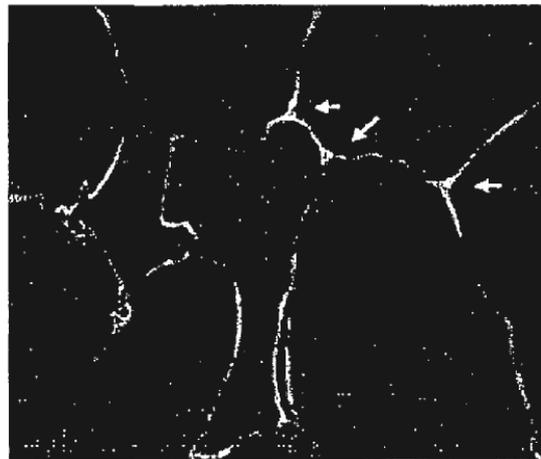


Figura 11

Royal Gala 16 semanas en frío x 40

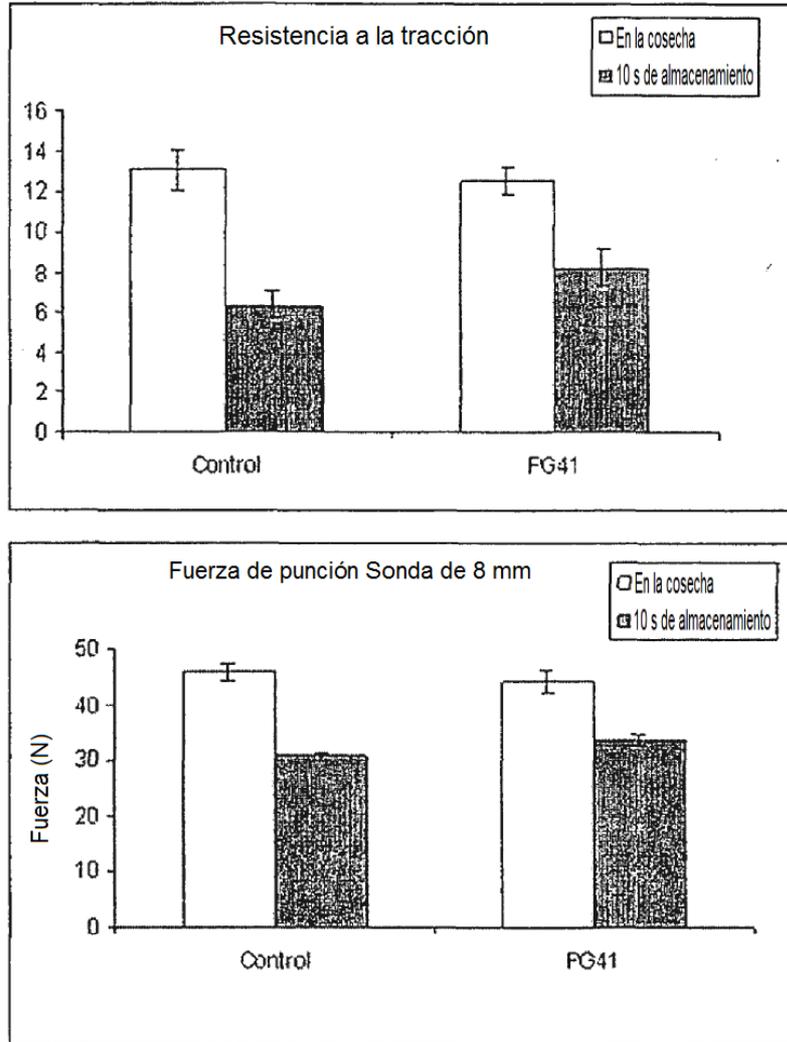


PG41 16 semanas en frío x 40



Anticuerpos JIM5 (homogalacturonano desmetilado) se dirigen a PG

**Figura 12**



% de cambio causado por 10 semanas almacenadas a 0,5 °C

|                           | Control | PG41  |
|---------------------------|---------|-------|
| Resistencia a la tracción | 51,40   | 34,26 |
| Fuerza de perforación     | 33,08   | 23,70 |

