

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 859**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/415** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2011 PCT/EP2011/066773**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO12041856**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2011 E 11761590 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2621943**

54 Título: **Modulación de la maduración de frutos de solanáceas**

30 Prioridad:

**30.09.2010 EP 10183748**

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

**14.05.2018**

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)**

**Schwarzwaldallee 215**

**4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BAXTER, CHARLES;**

**PAN, YU;**

**HODGMAN, THOMAS CHARLES;**

**SEYMOUR, GRAHAM BARRON;**

**CADE, REBECCA;**

**VAN WIJK, HENRICUS JOHANNES;**

**BRADLEY, GLYN;**

**GRIVET, LAURENT;**

**BOYDEN, LAURIE;**

**BALL, GRAHAM y**

**FRASER, PAUL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 667 859 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**

Modulación de la maduración de frutos de solanáceas

**INTRODUCCIÓN**

- 5 Las solanáceas, también llamadas solanos, comprenden más de 3000 especies, muchas de las cuales evolucionaron en Sudamérica en hábitats drásticamente variables incluyendo selvas tropicales y desiertos.
- Las solanáceas son económicamente el tercer taxón de plantas más importante y el más valioso en términos de cultivos de hortalizas. Son las más variables en términos de utilidad agrícola e incluyen varias hortalizas que albergan frutos tales como tomates y pimientos.
- 10 Los cultivos de solanáceas se han sometido a selección humana intensiva. Esto ha permitido su uso como modelos para estudiar la interfaz evolutiva entre plantas y personas. Algunas plantas solanáceas son sistemas de modelo importantes para biología; estos incluyen tomate para la maduración de frutos y la defensa de las plantas, tabaco para la defensa de las plantas y petunia para la biología de pigmentos de antocianina.
- 15 El tomate es un sistema de modelo importante para estudiar la maduración de los frutos debido a recursos genéticos y genómicos amplios. La recolección de los frutos del tomate cuando se ha establecido la maduración haría que la determinación de la madurez fuera más fácil que basándose en el color visible de la piel y aseguraría un desarrollo de calidad completo. Después de la recolección, continúa la maduración y avanza el ablandamiento, aumentando la susceptibilidad del fruto a daños por manipulación y limitando el periodo de comercialización.
- 20 Los mutantes de maduración en tomate tales como sin maduración incoloro e inhibidor de maduración han proporcionado importantes ideas sobre una estructura genética emergente que regula la maduración y modula la firmeza del fruto (Thompson *et al.*, 1999; Vrebalov *et al.*, 2002; Eriksson *et al.*, 2004; Manning *et al.*, 2006). El retardo en la maduración y el ablandamiento puede conseguirse empleando envasado en atmósfera modificada (MAP) que se ha estudiado ampliamente como método simple y barato de prolongar la vida útil de muchos frutos y hortalizas incluyendo el tomate (Batu y Thompson, 1998, Exama *et al.*, 1993, Geeson *et al.*, 1985), sin embargo, aumenta el coste del envasado y la manipulación de los frutos.
- 25 Los métodos existentes para modular la maduración de los frutos en programas de mejoramiento de plantas convencionales dependen del cribado de frutos recogidos desde plantas maduras. Cualquier identificación de maduración alterada en este escenario dependerá en gran medida de la casualidad. Actualmente no es económicamente viable o eficaz el mejoramiento para maduración alterada debido al coste y la complejidad del cultivo y fenotipado de grandes cantidades de plantas.
- 30 Las especies silvestre de tomate ofrecen una fuente rica y enormemente inexplorada de nueva variación genética para los obtentores. Tanksley y Zamir (Frary *et al.*, 2000; Fridman *et al.*, 2004) han demostrado que esta fuente de diversidad genética puede usarse para comprender la base molecular de rasgos de calidad importantes de los frutos y para proporcionar nuevo material para el mejoramiento.
- 35 Los obtentores están interesados en aprender acerca del proceso de desarrollo de la maduración de los frutos para producir nuevas variedades de frutos y hortalizas con fenotipos alterados previos y posteriores a la recolección. La manipulación de la maduración de los frutos ofrece el potencial de ampliar las ventanas de recolección y la vida útil, reduciendo de este modo las pérdidas previas y posteriores a la recolección en la cadena de producción.
- 40 En los tomates, la profundidad de la pigmentación de los frutos de tomate es muy importante para el interés y la salud y la nutrición del consumidor. Por lo tanto, existe una necesidad de descubrir genes que permitan una selección más eficaz de fenotipos de maduración temprana o retardada en frutos de tomate. Además, existe una necesidad de selección de genotipos que produzcan frutos con gran contenido de pigmentos en el estado verde maduro. Dichos genes podrían servir como marcador molecular para fenotipos de maduración de los frutos (velocidad hasta madurez, contenido de pigmentos) y ofrecen el potencial de manipular la velocidad hasta la maduración y el contenido de pigmentos en los frutos de tomate.
- 45 Los frutos de pimiento (*Capsicum annuum L.*) se han usado desde tiempos ancestrales como fuente de pigmentos para aumentar o cambiar el color de productos alimenticios, haciéndolos más atractivos y aceptables para el consumidor. El pimiento usado como colorante alimenticio tradicionalmente ha estado en forma de pimentón (polvo molido), aunque hoy en día se usan ampliamente las oleorresinas. Puede encontrarse información adicional respecto a los tipos de pimientos, en particular, los tipos de pimiento dulce, en Huh *et al.* (2001).

**50 SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a un factor de transcripción, y homólogos del mismo que están implicados en la modulación de la maduración de los frutos en la familia de las solanáceas. En el tomate, el factor de transcripción en cuestión (Le005930) se encontró por análisis de redes neurales artificiales en un conjunto de datos de matriz de tomate. El análisis posterior demostró que este factor de transcripción tenía un perfil específico de maduración en

tomate que aumentaba drásticamente entre 40 dpa (días posantesis) y 49 dpa. Le005930 tiene un alto grado de homología con un regulador 2 de respuesta de dos componentes (APRR2) de *Arabidopsis thaliana*. El gen que codifica Le005930 (a partir de ahora en este documento también conocido como APRR2 de tomate o de tipo APRR2 de tomate) está representado en la SEQ ID NO: 1. Las plantas de tomate que sobreexpresan el gen que se muestra en la SEQ ID NO: 1 han demostrado en este documento presentar propiedades de maduración potenciada de los frutos mientras que las plantas de tomate que tienen niveles regulados por disminución del gen presentan propiedades de maduración más lenta.

Para encontrar el gen homólogo en pimiento (en este documento mencionado como APRR2 de pimiento o de tipo APRR2 de pimiento), se usó la secuencia EST de tomate (SGN-U585565) para someter a BLAST una base de datos de EST de pimiento. Pueden encontrarse detalle adicionales del aislamiento de la secuencia de tipo APRR2 de pimiento en la sección de ejemplos. El análisis ha revelado la importancia del gen de tipo APRR2 de pimiento en el proceso de maduración del pimiento. La secuencia de ADNc de APRR2 de pimiento puede encontrarse en la SEQ ID NO: 2.

La presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de nucleótidos aislada seleccionada del grupo que consiste en: a) una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1; b) una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de a); c) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de cualquiera de las secuencias de nucleótidos a) a b); y d) una secuencia de nucleótidos que es el complemento a las secuencias de nucleótidos de una cualquiera de a) a c). En una realización, la secuencia de nucleótidos de la etapa b) es al menos un 90% idéntica a la secuencia de nucleótidos de a).

En una realización, la secuencia de nucleótidos aislada está en la orientación codificante. En otra realización, la secuencia de nucleótidos aislada está en la orientación no codificante.

También se proporciona una célula hospedadora que expresa un vector de la invención.

También se proporciona una planta transgénica o parte de la misma que comprende una célula hospedadora de la invención. En una realización, la planta transgénica o parte de la misma es una monocotiledónea. En otras realizaciones, la planta o parte de la misma es una dicotiledónea, por ejemplo, un tomate, preferiblemente *Solanum lycopersicum* o un pimiento, preferiblemente *Capsicum annuum*.

También se proporciona un método para producir una planta transgénica que comprende regenerar una planta a partir de una células hospedadora de acuerdo con la invención.

También se proporciona una planta cultivada o parte de la misma producida por un método de acuerdo con la invención.

También se proporciona un método de manipulación de la velocidad de maduración de los frutos en frutos de una planta solanácea transgénica, preferiblemente una planta de tomate o de pimiento, que comprende transformar dicha planta con un vector de la invención. En una realización, la velocidad de maduración de los frutos está aumentada en comparación con frutos de una planta no transformada. En otra realización, la velocidad de maduración de los frutos está disminuida en comparación con frutos de una planta no transformada. En una realización, la velocidad de maduración de los frutos se mide a 40 hasta 49 dpa. En una realización, la velocidad de maduración de los frutos se mide en el estado verde maduro de la planta transformada. En una realización, la velocidad de maduración de los frutos se mide en el estado de color inmaduro en pimiento.

También se proporciona un método de manipulación del contenido de pigmentos de los frutos en frutos de una planta solanácea transgénica, que comprende transformar dicha planta con un vector de la invención. En una realización, el contenido de pigmentos del fruto está aumentado en una planta transformada en comparación con el fruto de una planta no transformada. En una realización, el contenido de pigmentos del fruto está disminuido en comparación con el fruto de una planta no transformada. En una realización, el contenido de pigmentos del fruto se mide a 40 hasta 49 dpa. En una realización, el pigmento del fruto se mide en el estado verde maduro de la planta transformada. En una realización, el contenido de pigmentos del fruto se mide en el estado de color inmaduro en pimiento.

También se proporciona una planta de tomate o parte de la misma obtenida por cualquier método de la invención.

También se proporciona un método de detección de marcadores genéticos indicativos de la velocidad de maduración o del contenido de pigmentos del fruto de una planta de la familia de las solanáceas, que comprende aislar ADN de dicha planta y de uno o ambos progenitores de dicha planta; cribar los marcadores genéticos en una región de dicho ADN en o cerca de la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1, y determinar la herencia conjunta de dichos marcadores de uno o ambos progenitores a dicho individuo.

También se proporciona un marcador genético detectable por un método de la invención.

También se proporciona el uso de un marcador genético de la invención para la producción de una planta solanácea cultivada, preferiblemente una planta de tomate o pimiento que puede albergar frutos.

También se proporciona una planta solanácea cultivada o parte de la misma producida por un método de la invención.

- 5 También se proporciona el uso de una planta solanácea cultivada o parte de la misma de acuerdo con la invención en el mercado de productos frescos o para el procesamiento de alimentos.

También se proporciona el uso de una secuencia de nucleótidos aislada de la invención en la manipulación de la velocidad de maduración o del contenido de pigmentos del fruto de una planta, preferiblemente una planta de tomate o pimiento, donde dicha manipulación se logra por modificación genética de dicha planta.

- 10 También se proporciona el uso de un método de acuerdo con la invención, donde dicha modificación genética se introduce por TILLING.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**Figura 1.** Valores medios para la expresión de Le 005930 en mutantes de tomate (A) WT, (B) RIN, (C) NOR y (D) CNR. Las barras de error son E.T.M., dpa = días posantesis, ua = unidades arbitrarias.

- 15 **Figura 2.** Datos de qPCR que muestran la expresión relativa de líneas de tomate que sobreexpresan Le5390 (TP229, TP232 y TP264) en diferentes estados del desarrollo en comparación con el tipo silvestre (WT). IMG = estado verde inmaduro; MG = estado verde maduro; y B = fase de irrupción.

**Figura 3.** Datos de índice de color de tomate para líneas que sobreexpresan Le5390 en diferentes estados del desarrollo en comparación con el tipo silvestre. Abreviaturas iguales que para la figura 2.

- 20 **Figura 4.** Datos del ensayo de textura de tomate para A) frutos que sobreexpresan Le5930 y B) frutos iARN Le5930 en comparación con el tipo silvestre en el estado verde maduro.

**Figura 5.** Datos del contenido de clorofila total en el pericarpio exterior e interior para líneas de tomate que sobreexpresan Le5930 en el estado del desarrollo verde maduro en comparación con el tipo silvestre.

- 25 **Figura 6.** Datos de contenido de carotenoides total para líneas de tomate de sobreexpresión de Le5930 TP224, TP229, TP231, TP232 y TP264 en comparación con el tipo silvestre.

**Figura 7.** Fotografías que representan fruto de tomate que sobreexpresa Le5930 (TP232) y fruto de tipo silvestre en A) el estado verde inmaduro, B) el estado verde maduro y C) el estado de irrupción. El fruto TP232 y el fruto de tipo silvestre se muestran en la izquierda y derecha de cada foto respectivamente.

- 30 **Figura 8.** A) perfil de expresión del gen de tipo APRR2 en líneas de pimiento progenitoras de frutos rojos y blancos y B) suma de todos los transcritos de proteína de unión a clorofila.

**Figura 9.** Análisis de la presencia de A) el gen de tipo APRR2 y B) el gen PSY1 de las líneas de pimiento progenitoras blanca y roja a través de la población de cartografiado de color maduro. La frecuencia de la presencia de alelo se muestra en el eje de ordenadas. El color del fruto se muestra en el eje de abscisas. DG = verde oscuro; LG = verde claro; MG = verde maduro; y W = blanco.

- 35 **Figura 10.** Análisis de qRTPCR de la expresión del gen de tipo APRR2 en la población de pimiento de color maduro en la fase inmadura (inm) y de irrupción. Las barras representan la media de varios puntos de datos. La secuencia génica completa se representa por APRR2+. La secuencia génica truncada en que el mensaje codifica un codón de parada se representa por APRR2-.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 40 La presente invención describe un factor de transcripción que puede expresarse en una planta solanácea transgénica para modular la maduración de un fruto que crece en dicha planta. En tomate, este factor de transcripción se encontró como resultado del análisis de redes neurales artificiales en un conjunto de datos de matriz de tomate. El homólogo de APRR2 de tomate también se encontró en pimiento (véase la sección de ejemplos). En particular, la invención se refiere a un vector que comprende una secuencia de nucleótidos aislada seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 (correspondiente a la secuencia de ADNc de APRR2 de tomate). En otra realización, la secuencia de nucleótidos puede ser al menos un 80% idéntica, preferiblemente al menos un 90% idéntica, más preferiblemente al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 97%, mucho más preferiblemente al menos un 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos de a). En otra realización, la secuencia de nucleótidos de la invención puede hibridar en condiciones rigurosas con el complemento de cualquiera de las secuencias de nucleótidos a) a b). En otra realización, la secuencia de nucleótidos de la invención puede ser el complemento de las secuencias de nucleótidos de una cualquiera de a) a c).
- 50

Pueden usarse diversas construcciones de vectores de ADN para obtener un fenotipo de maduración de frutos modulada de acuerdo con la presente invención. La construcción de ADN o un vector de expresión que comprende la misma puede comprender además elementos reguladores incluyendo, aunque sin limitación, un promotor, un potenciador y una señal de terminación. Entre los promotores más habitualmente usados están el promotor de la nopalina sintasa (NOS) (Ebert *et al.*, 1987), el promotor de la octapina sintasa (OCS), promotores de caulimovirus tales como el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Lawton *et al.*, 1987), el promotor 35S de CaMV (Odell *et al.*, 1985) y el promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia, el promotor inducible por luz de la subunidad pequeña de rubisco, el Adh, el promotor de la sacarosa sintasa, el promotor del complejo génico R y el promotor génico de la proteína de unión a clorofila a/b, etc. Otros promotores usados habitualmente son los promotores para los genes ADPGPP de tubérculo de patata, el promotor de la sacarosa sintasa, el promotor del gen Brittle, el promotor de la sintasa de almidón unido a gránulo, el promotor del gen de la glutelina, el promotor de Waxy de maíz y el promotor de Shrunken 2, el promotor del gen de la quitinasa ácida y promotores del gen de ceína. Muchos promotores se describen en la solicitud de patente WO 00/18963.

La expresión "secuencias no codificantes 3'" se refiere a secuencias de ADN que están ubicadas en dirección 3' de una secuencia codificante y se entiende que también incluyen secuencias de reconocimiento de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras que pueden afectar al procesamiento del ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación habitualmente se caracteriza por afectar a la adición de tramos de poli(ácido adenílico) al extremo 3' del precursor de ARNm.

Los expertos en la materia apreciarán que los componentes de las secuencias de ácido nucleico y los vectores de transformación descritos en este documento están unidos de forma funcional, para provocar la expresión de dicho ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico. Las técnicas para unir de forma funcional los componentes de las construcciones y vectores de la presente invención son bien conocidas para los expertos en la materia e incluyen el uso de conectores, tales como conectores sintéticos que incluyen, por ejemplo, uno o más sitios de enzima de restricción. El vector podría ser un vector de alto rendimiento binario Gateway mejorado como se describe en Nakagawa *et al.* (2007), por ejemplo, el vector pGWB405 que es adecuado para su uso como un vector de sobreexpresión y se describe en el ejemplo 3. En una realización, el gen para la sobreexpresión puede clonarse delante del promotor 35S de CaMV. Otros promotores que se divulgan en este documento también pueden ser adecuados. Para la producción de construcción de iARN, un fragmento de secuencia codificante debe clonarse preferiblemente en un vector adecuado. El vector puede ser, en algunas realizaciones, un vector de iARN de sistema Gateway. En una realización, el vector puede ser pK7GWIWG2.

También se proporciona un vector como se describe en este documento, donde la secuencia de nucleótidos aislada está en orientación codificante o no codificante, preferiblemente en la orientación codificante. También se proporciona una célula hospedadora que expresa el vector como se describe en este documento.

También se proporciona una planta transgénica o parte de la misma que comprende la célula hospedadora como se describe en este documento. El experto en la materia estaría bien familiarizado con métodos para transformar una célula vegetal con secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El término "transformación" o "transformar", como se usa en este documento, describe un proceso por el que un ADN foráneo, tal como una construcción de ADN, entra y cambia una célula destinataria en una célula transformada, modificada genéticamente o transgénica. La transformación puede ser estable, donde la secuencia de ácido nucleico se integra en el genoma de la planta y por tanto representa un rasgo estable y hereditario, o transitoria, donde la secuencia de ácido nucleico se expresa por la célula transformada, pero no se integra en el genoma. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de la presente invención se transforma de forma estable en una célula vegetal. Los expertos en la materia conocen diversos métodos para introducir genes foráneos tanto en plantas monocotiledóneas como en dicotiledóneas (por ejemplo, Shimamoto K. *et al.*, 1989). La transformación eficaz de pimienta dulce mediada por el factor de transcripción BABY BOOM se ha descrito recientemente por Heidmann *et al.*, 2011.

Los métodos mejor conocidos de la integración estable de ADN exógeno en ADN genómico vegetal implica dos estrategias principales.

La primera de dichas estrategias es la captación directa de ADN. Existen diversos métodos para la transferencia directa de ADN en células vegetales. En electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un fuerte campo eléctrico, abriendo miniporos para permitir la entrada del ADN. En microinyección, el ADN se inyecta mecánicamente de forma directa en las células usando micropipetas. En el bombardeo de micropartículas, el ADN se adsorbe sobre microproyectiles tales como cristales de sulfato de magnesio o partículas de tungsteno, y los microproyectiles se aceleran físicamente en células o tejidos vegetales. La segunda estrategia es la transferencia génica media por *Agrobacterium*. El sistema mediado por *Agrobacterium* incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos de ADN definidos que se integran en el ADN genómico de la planta. Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían dependiendo de las especies de las plantas y el sistema de suministro de *Agrobacterium*. Una estrategia ampliamente usada es el procedimiento de disco foliar, que puede realizarse con cualquier explante de tejido que proporcione una buena fuente para el inicio de diferenciación de la planta completa. Una estrategia complementaria emplea el sistema de suministro de *Agrobacterium* en combinación con infiltración al vacío. El sistema de *Agrobacterium* es especialmente útil en la generación de plantas dicotiledóneas transgénicas.

La regeneración, desarrollo y cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplastos vegetales individuales o de diversos explantes transformados son bien conocidos para los expertos en la materia. El proceso típicamente incluye las etapas de selección de células transformadas, cultivo de esas células individualizadas a través de fases habituales del desarrollo embrionario a través de la fase de plántula con raíces. Las semillas y embriones transgénicos se regeneran de una manera similar. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se plantan posteriormente en un medio de cultivo vegetal adecuado tal como tierra.

El desarrollo o regeneración de plantas que contienen el gen exógeno foráneo que codifica una proteína de interés es bien conocido en la técnica. Preferiblemente, las plantas regeneradas se autopolinizan para proporcionar plantas transgénicas homocigóticas. De lo contrario, el polen obtenido de las plantas regeneradas se cruza con plantas que han crecido a partir de semillas de líneas agrónomicamente importantes, o el polen de plantas de estas líneas importantes se usa para polinizar plantas regeneradas. Una planta transgénica de la presente invención que tiene un fenotipo de maduración de los frutos modulada puede cultivarse usando métodos bien conocidos para los expertos en la materia.

En una realización, la planta transgénica de la invención o parte de la misma puede ser una monocotiledónea. En otra realización, la planta transgénica de la invención puede ser una dicotiledónea. En una realización, una planta transgénica dicotiledónea de la invención es una planta de tomate, preferiblemente *S. lycopersicum* o una planta de pimiento, preferiblemente *C. annuum*.

También se proporciona un método para producir una planta transgénica, que comprende regenerar una planta a partir de la célula hospedadora de acuerdo con la invención. Por ejemplo, puede transferirse una secuencia de ácido nucleico cruzando una planta donadora con una planta destinataria, es decir, por introgresión, por transformación, por fusión de protoplastos, por una técnica de haploide duplicado, por rescate de embriones o por cualquier otro sistema de transferencia de ácido nucleico, seguido de selección de plantas de la descendencia que comprenden uno o más de los QTL divulgados en la presente y que muestran firmeza aumentada de los frutos. Para métodos transgénicos de transferencia, una secuencia de ácido nucleico que comprende un gen implicado en la modulación de la firmeza de los frutos puede aislarse de la planta donadora usando métodos conocidos en la técnica, y la secuencia de ácido nucleico así aislada puede transferirse a la planta destinataria por métodos transgénicos, por ejemplo, mediante un vector, en un gameto o en cualquier otro elemento de transferencia adecuado, tal como una partícula balística recubierta con la secuencia de ácido nucleico.

La transformación de plantas generalmente implica la construcción de un vector de expresión que funcionará en células de plantas. En el asunto divulgado en la presente, dicho vector comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico aislada de la invención, que es un vector que puede comprender un gen que confiere un fenotipo de maduración de los frutos aumentada que está bajo el control de, o unido de forma funcional a, un elemento regulador tal como un promotor. El vector de expresión puede contener una o más de dichas combinaciones de gen/elemento regulador unidos de forma funcional, con la condición de que al menos uno de los genes contenido en las combinaciones potencie la velocidad de maduración. El vector o vectores pueden estar en forma de un plásmido y pueden usarse en solitario o en combinación con otros plásmidos para proporcionar plantas transgénicas que tengan velocidad de maduración potenciada usando métodos de transformación conocidos en la técnica, tales como el sistema de transformación de *Agrobacterium* como se describe en este documento.

También se proporciona una planta cultivada o parte de la misma producida por un método de acuerdo con la invención.

También se proporciona un método de manipulación de la velocidad de maduración de los frutos en frutos de una planta solanácea transgénica, que comprende transformar dicha planta con un vector de la invención.

En una realización, la velocidad de maduración de los frutos está aumentada en comparación con frutos de una planta no transformada. En una realización, el fruto de una planta transformada, preferiblemente una planta de tomate, alcanza el estado verde maduro significativamente antes que la planta de control no transformada. En una realización, el fruto de una planta transformada, preferiblemente una planta de pimiento, alcanza el estado de color inmaduro significativamente antes que el fruto de una planta no transformada.

En una realización, la velocidad de maduración de los frutos está disminuida en comparación con frutos de una planta no transformada.

En una realización, la velocidad de maduración de los frutos se mide a 40 hasta 49 dpa. En una realización, la velocidad de maduración de los frutos se mide en el estado verde maduro de la planta transformada. En una realización, la velocidad de maduración de los frutos de pimiento se mide en el estado de color inmaduro de la planta transformada.

También se proporciona un método de manipulación del contenido de pigmentos de los frutos en frutos de una planta solanácea transgénica, que comprende transformar dicha planta con el vector de la invención.

En una realización, el contenido de pigmentos del fruto está aumentado en comparación con el fruto de una planta no transformada.

En una realización, el contenido de pigmentos del fruto está disminuido en comparación con el fruto de una planta no transformada.

En una realización, el contenido de pigmentos del fruto se mide a 40 hasta 49 dpa. En una realización, el contenido de pigmentos del fruto se mide en el estado verde maduro de la planta transformada. En una realización, el contenido de pigmentos del fruto se mide en el estado de color inmaduro en pimiento.

También se proporciona una planta solanácea o parte de la misma obtenida por cualquiera de los métodos de la invención.

También se proporciona un método de detección de marcadores genéticos indicativos de la velocidad de maduración o del contenido de pigmentos del fruto de una planta de la familia de las solanáceas, que comprende a) aislar ADN de dicha planta y de uno o ambos progenitores de dicha planta; b) cribar los marcadores genéticos en una región de dicho ADN en o cerca de la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1, y c) determinar la herencia conjunta de dichos marcadores de uno o ambos progenitores a dicho individuo.

Los expertos en la materia entenderán que es adecuada una muestra de casi cualquier tejido vegetal para ensayos de ADN genómico. Por ejemplo, las muestras convenientes incluyen tejidos obtenidos de raíces, hojas, tallos y frutos y partes de los mismos. Los ensayos de ADNc o ARNm implican obtener una muestra tisular de un órgano en que

se expresa el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la muestra de ADN genómico se obtiene de hojas o raíces y, en algunos casos, se procesa adicionalmente antes de la etapa de detección, por ejemplo, el ADN en la muestra celular o tisular puede separarse de otros componentes de la muestra, o puede amplificarse, etc.

En general, si la alteración está ubicada en un gen, puede estar en una región no codificante o codificante del gen.

5 Si está ubicada en una región codificante, la alteración puede provocar una alteración de aminoácido. Dicho cambio puede tener o no un efecto sobre la función o actividad del polipéptido codificado. Si el cambio está ubicado en una región no codificante puede causar corte y empalme alternativo, que también puede tener o no un efecto sobre la actividad o función de la proteína codificada.

10 Debe entenderse que la identificación de marcadores asociados con el fenotipo de maduración de los frutos modulada detectando uno o más productos génicos variantes también está incluida dentro del alcance de la presente invención. Un "producto génico variante", como se usa en este documento, se refiere a un producto génico que está codificado por un gen alterado que codifica APRR2 de tomate incluyendo, aunque sin limitación, un producto génico de longitud completa como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o codificado por un gen alterado que codifica APRR2 de pimiento incluyendo, aunque sin limitación, un producto génico de longitud completa como se muestra en la SEQ ID NO: 2; un producto génico esencialmente de longitud completa del mismo, un fragmento biológicamente activo del producto génico y un producto génico biológicamente inactivo. Debe entenderse que los fragmentos biológicamente activos incluyen cualquier parte del polipéptido de longitud completa que inicia la transcripción comparable al tipo silvestre. Un producto génico variante también pretende indicar productos génicos que tienen niveles de expresión o patrones de expresión alterados que están causados, por ejemplo, por el alelo variante de una o más secuencias reguladoras. Como se usa en este documento, la expresión "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de célula hospedadora y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos únicamente en ciertas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). En algunas realizaciones, la alteración se identifica en una región no codificante tal como un intrón, un sitio de poliadenilación y/o una secuencia líder. En algunas otras realizaciones, la alteración se identifica en una secuencia reguladora. La detección de alteraciones en el ADN examinado normalmente requiere la amplificación del ADN recogido de la planta candidata. Los métodos para la amplificación de ADN son bien conocidos para los expertos en la materia. El método más habitualmente usado para la amplificación de ADN es PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Métodos adicionales de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por transcripción y replicación de secuencia autosostenida, y amplificación de secuencia basada en ácido nucleico (NASBA). Los dos últimos métodos de amplificación implican reacciones isotérmicas basadas en transcripción isotérmica, que producen tanto ARN monocatenario (ARNmc) como ADN bicatenario (ADNbc) como productos de amplificación en una relación de aproximadamente 30 o 100 a 15, respectivamente.

35 De acuerdo con ciertas realizaciones, la identificación de la al menos una alteración se realiza por una técnica seleccionada del grupo que consiste en: secuenciación de terminador, digestión de restricción, reacción de la polimerasa específica de alelo, análisis de polimorfismos conformacionales monocatenarios, análisis de pequeñas partes genéticas, electroforesis en gel con gradiente de temperatura, reacción en cadena de la ligasa y análisis de pequeñas partes genéticas con ligasa/polimerasa.

40 En ciertas realizaciones, la alteración en la secuencia génica codificada por la secuencia de ADNc de APRR2 de tomate expuesta en la SEQ ID NO: 1 se identifica empleando nucleótidos con una característica detectable seleccionada del grupo que consiste en masa inherente, marca de masa, carga eléctrica, molécula de hapteno, espín eléctrico, molécula bioluminiscente de tipo isotipo radiactivo, molécula quimioluminiscente, molécula de ácido nucleico marcada, molécula proteínica, molécula de dispersión de luz/desplazamiento de fase y molécula fluorescente.

También se proporciona un marcador genético detectable por el método de la invención.

También se proporciona el uso de un marcador genético de la invención para la selección de una planta solanácea cultivada, preferiblemente una planta de tomate o pimiento que puede albergar frutos.

50 También se proporciona una planta de tomate o pimiento cultivada o parte de la misma seleccionada por un método de la invención.

También se proporciona el uso de una planta de tomate o pimiento cultivada o parte de la misma de acuerdo con la invención en el mercado de productos frescos o para el procesamiento de alimentos.

55 También se proporciona el uso de la secuencia de nucleótidos aislada de la invención en la manipulación de la velocidad de maduración o del contenido de pigmentos del fruto de una planta, preferiblemente una planta de tomate o pimiento, donde dicha manipulación se logra por modificación genética de dicha planta.

También se proporciona el uso de acuerdo con la invención, donde dicha modificación genética se introduce por un método seleccionado de la lista que consiste en TILLING.

## DEFINICIONES

60 A las expresiones y términos técnicos usados dentro del alcance de esta solicitud generalmente se les da el significado habitualmente aplicado a los mismos en la técnica relevante de mejoramiento y cultivo de plantas si no se indica lo contrario en este documento a continuación.

Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen sus plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia "una planta" incluye una o más plantas y la referencia a "una célula" incluye mezclas de células, tejidos y similares.

5 Como se usa en este documento, se entiende que el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor o a una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje, abarca variaciones de, en algunas realizaciones  $\pm 20\%$ , en algunas realizaciones  $\pm 10\%$ , en algunas realizaciones  $\pm 5\%$ , en algunas realizaciones  $\pm 1\%$ , en algunas realizaciones  $\pm 0,5\%$  y en algunas realizaciones  $\pm 0,1\%$  de la cantidad especificada, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar el método divulgado.

10 Se entiende dentro del alcance de la invención que un "alelo" se refiere a formas alternativas o variantes de diversas unidades genéticas idénticas o ligadas a diferentes formas de un gen o de cualquier tipo de elemento genético identificable, que son alternativas en herencia porque están situadas en el mismo locus en cromosomas homólogos. Dichas formas alternativas o variantes pueden ser el resultado de polimorfismos mononucleotídicos, inserciones, inversiones, traslocaciones o eliminaciones, o la consecuencia de la regulación génica causada por, por ejemplo, modificación química o estructural, regulación de la transcripción o modificación/regulación postraduccional. En una  
15 célula u organismo diploide, los dos alelos de un gen o elemento genético dado típicamente ocupan los locus correspondientes en un par de cromosomas homólogos.

Un alelo ligado a un rasgo cuantitativo puede comprender formas alternativas o variantes de diversas unidades genéticas incluyendo las que son idénticas o están ligadas a un único gen o múltiples genes o sus productos o  
20 incluso un gen que se altera o está controlado por un factor genético que contribuye al fenotipo presentado por dicho QTL.

Como se usa en este documento, el término "reproducción", y variantes gramaticales del mismo, se refieren a cualquier proceso que genere un individuo de la descendencia. La reproducción puede ser sexual o asexual, o cualquier combinación de las mismas. Los tipos no limitantes ejemplares de reproducción incluyen cruces, autopolinización, generación de derivados haploides duplicados y combinaciones de los mismos.  
25

Como se usa en este documento, el término "construcción" se refiere a una molécula de ácido nucleico ensamblada artificialmente o aislada que incluye el gen de interés. Una construcción puede incluir el gen o genes de interés, un gen marcador (que en algunos casos también puede ser el gen de interés) y secuencias reguladoras adecuadas. La inclusión de secuencias reguladoras en una construcción a veces es opcional, por ejemplo, dichas secuencias  
30 pueden no ser necesarias en situaciones donde tienen que usarse las secuencias reguladoras de una célula hospedadora. El término construcción incluye vectores pero no debe interpretarse como limitado a ello.

Se entiende dentro del alcance de la invención que una "planta de tomate cultivada" o "planta de pimiento cultivada" se refiere a una planta que ya no está en el estado natural, sino que se ha desarrollado mediante cuidados humanos y para uso y/o consumo de seres humanos. Se entiende además que "plantas cultivadas" excluye aquellas especies  
35 de tipo silvestre que comprenden el rasgo que es objeto de esta invención como un rasgo natural y/o parte de su genética natural.

Como se usa en este documento, el término "gen" se refiere a una unidad hereditaria que incluye una secuencia de ADN que ocupa una localización específica en un cromosoma y que contiene la instrucción genética para una característica o rasgo particular en un organismo.

40 "Manipulación genética", "transformación" y "modificación genética" se usan todas en este documento como sinónimos para la transferencia de genes aislados y clonados en el ADN, normalmente el ADN cromosómico o genoma, de otro organismo.

Como se usa en este documento, las expresiones "marcador genético", "marcador de ADN" o "marcador molecular" son intercambiables y se refieren a una característica del genoma de un individuo (por ejemplo, un nucleótido o una  
45 secuencia polinucleotídica que está presente en el genoma de un individuo) que está ligada a uno o más locus de interés. En algunas realizaciones, un marcador genético es polimórfico en una población de interés, o el locus ocupado por el polimorfismo, dependiendo del contexto. Los marcadores genéticos incluyen, por ejemplo, polimorfismos mononucleotídicos (SNP), indels (es decir, inserciones/eliminaciones), repeticiones de secuencia simple (SSR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórficos amplificados aleatoriamente (RAPD), marcadores de secuencia polimórfica amplificada y escindida (CAPS), marcadores de  
50 tecnología de matrices de diversidad (DArT) y polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (AFLP) entre muchos otros ejemplos. Los marcadores genéticos pueden usarse, por ejemplo, para localizar locus genéticos que contienen alelos en un cromosoma que contribuye a variabilidad de rasgos fenotípicos. La expresión "marcador genético" también puede referirse a una secuencia polinucleotídica complementaria a una secuencia genómica, tal como una secuencia de un ácido nucleico usado como sonda. Un marcador genético o molecular puede estar  
55 físicamente ubicado en una posición en un cromosoma que está distal o proximal a los locus genéticos con los que está ligado (es decir, es intragénico o extragénico, respectivamente). Indicado de otra manera, mientras que los marcadores genéticos típicamente se emplean cuando la ubicación en un cromosoma del gen o de una mutación



funcional, por ejemplo, dentro de un elemento de control fuera de un gen, que corresponde al locus de interés no se ha identificado y hay una tasa muy baja de recombinación entre el marcador genético y el locus de interés, el asunto divulgado en la presente también puede emplear marcadores genéticos que están físicamente dentro de los límites de un locus genético (por ejemplo, dentro de una secuencia genómica que corresponde a un gen tal como, aunque sin limitación, un polimorfismo dentro de un intrón o un exón de un gen). En algunas realizaciones del asunto divulgado en la presente, el uno o más marcadores genéticos comprenden entre uno y diez marcadores, y en algunas realizaciones el uno o más marcadores genéticos comprenden más de diez marcadores genéticos.

Como se usa en este documento, el término "genotipo" se refiere a la constitución genética de una célula u organismo. El "genotipo para un conjunto de marcadores genéticos" de un individuo incluye los alelos específicos para uno o más locus marcadores genéticos, presentes en el haplotipo de un individuo. Como se sabe en la técnica, un genotipo puede estar relacionado con un único locus o con múltiples locus, pudiendo estar los locus relacionados o no relacionados y/o ligados o no ligados. En algunas realizaciones, el genotipo de un individuo se refiere a uno o más genes que están relacionados, en que el uno o más genes están implicados en la expresión de un fenotipo de interés (por ejemplo, un rasgo cuantitativo como se define en este documento). Por tanto, en algunas realizaciones, un genotipo comprende un sumario de uno o más alelos presentes dentro de un individuo en uno o más locus genéticos de un rasgo cuantitativo. En algunas realizaciones, un genotipo se expresa en función de un haplotipo (definido en este documento a continuación).

Se entiende dentro del alcance de la invención que "heterocigótico" se refiere a alelos diferentes en uno o más locus correspondientes en cromosomas homólogos.

Se entiende dentro del alcance de la invención que "homocigótico" se refiere a alelos similares en uno o más locus correspondientes en cromosomas homólogos.

Como se usa en este documento, el término "híbrido" en el contexto de reproducción de plantas se refiere a una planta que es la descendencia de progenitores genéticamente diferentes producidos por el cruce de plantas de diferentes líneas o variedades o especies, incluyendo, aunque sin limitación, el cruce entre dos líneas endogámicas.

El término "hibridar", como se usa en este documento, se refiere a condiciones convencionales de hibridación, preferiblemente a condiciones de hibridación en que se usa SSPE 5x, SDS al 1%, solución de Denhardt 1x como una solución y/o las temperaturas de hibridación están entre 35°C y 70°C, preferiblemente 65°C. Después de la hibridación, el lavado se realiza preferiblemente en primer lugar con SSC 2x, SDS al 1% y posteriormente con SSC 0,2x a temperaturas entre 35°C y 75°C, particularmente entre 45°C y 65°C, pero especialmente a 59°C (respecto a la definición de SSPE, SSC y solución de Denhardt, véase Sambrook *et al.* (2001)). Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad como se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (2001), son particularmente preferidas. Las condiciones rigurosas de hibridación particularmente preferidas están presentes, por ejemplo, si la hibridación y el lavado se produce a 65°C como se indica anteriormente. Las condiciones de hibridación no rigurosas, por ejemplo, con hibridación y lavado realizados a 45°C son menos preferidas y a 35°C incluso menos.

Se entiende dentro del alcance de la invención que "aumento en la firmeza de los frutos" y "firmeza de los frutos aumentada" significan frutos de tomate o pimiento que tienen un valor de carga máxima aumentado, estadísticamente significativo a  $P < 0,05$  o  $P < 0,01$  en comparación con frutos de una planta no transformada de control. La carga máxima se define como el valor que representa la carga mayor (en Newton (N)) requerida para causar el fallo de la integridad tisular.

Como se usa en este documento, las expresiones "introgresión", "sometido a introgresión" y "someter a introgresión" se refieren al proceso por el que los genes, un QTL o haplotipo de una especie, variedad o variedad de cultivo se mueven al genoma de otra especie, variedad o variedad de cultivo, por cruce de esas especies. El cruce puede ser natural o artificial. El proceso puede completarse opcionalmente por retrocruzamiento con el progenitor recurrente, en cuyo caso la introgresión se refiere a la infiltración de los genes de una especie en la combinación de genes de otra a través de retrocruzamiento repetido de un híbrido interespecífico con uno de sus progenitores. Una introgresión también puede describirse como un material genético heterólogo integrado de forma estable en el genoma de una planta destinataria.

El término "aislado", como se usa en este documento, significa a) separado de al menos algunos de los componentes con que está habitualmente asociado en la naturaleza; b) preparado o purificado por un proceso que implica intervención humana; y/o c) no encontrado en la naturaleza. En particular, "aislado" se usa en este documento para describir un polinucleótido de la invención que se ha separado hasta algún grado de otros compuestos incluyendo, aunque sin limitación, otros ácidos nucleicos, carbohidratos y proteínas (tales como las enzimas usadas en la síntesis del polinucleótido) o la separación de polinucleótidos covalentemente "cerrados" de polinucleótidos lineales. Un polinucleótido está sustancialmente aislado cuando al menos aproximadamente un 50%, más preferiblemente entre un 60 y un 75% de una muestra presenta una única secuencia polinucleotídica y conformación (una conformación lineal frente a una covalentemente cerrada). El grado de aislamiento u homogeneidad polinucleotídica puede indicarse por varios medios bien conocidos para los expertos en la materia, tales como electroforesis en agarosa o electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra, seguida de

visualización de una única banda polinucleotídica en un gel teñido. Además puede proporcionarse mayor resolución usando HPLC u otros medios bien conocidos para los expertos en la materia.

5 Como se usa en este documento, el término "ligamiento" y variantes gramaticales del mismo, se refiere a la tendencia de alelos en diferentes locus en el mismo cromosoma de segregarse juntos más a menudo que lo que se esperaría por probabilidad si su transmisión fuera independiente, en algunas realizaciones como una consecuencia de su proximidad física. El ligamiento se mide por el porcentaje de recombinación entre locus (centimorgan, cM).

Se entiende dentro del alcance de la invención que "locus" se refiere a una región en un cromosoma, que comprende un gen o cualquier otro elemento genético o factor que contribuye a un rasgo.

10 Como se usa en este documento, la expresión "alelo marcador" se refiere a una forma alternativa o variante de una unidad genética como se define en este documento anteriormente, cuando se usa como un marcador para ubicar locus genéticos que contienen alelos en un cromosoma que contribuyen a la variabilidad de los rasgos genotípicos.

15 Se entiende dentro del alcance de la invención que "selección basada en marcador" se refiere a, por ejemplo, el uso de marcadores genéticos para detectar uno o más ácidos nucleicos de la planta, donde el ácido nucleico está ligado a un rasgo deseado para identificar plantas que portan genes, QTL o haplotipos para rasgos deseables (o indeseables), de modo que esas plantas puedan usarse (o evitarse) en un programa de mejoramiento selectivo.

"Selección asistida por marcador" se refiere al proceso de selección de un rasgo deseado o rasgos deseados en una planta cultivada o plantas cultivadas detectando uno o más ácidos nucleicos de la planta cultivada, donde el ácido nucleico está ligado al rasgo deseado.

20 Como se usa en este documento, "locus marcador" se refiere a una región en un cromosoma, que comprende un nucleótido o una secuencia polinucleotídica que está presente en el genoma de un individuo y que está ligada a uno o más locus de interés, que puede comprender un gen o cualquier otro elemento genético o factor que contribuye a un rasgo. "Locus marcador" también se refiere a una región en un cromosoma, que comprende una secuencia polinucleotídica complementaria a una secuencia genómica, tal como una secuencia de un ácido nucleico usado como sonda.

25 "Ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido" o equivalentes gramaticales de los mismos usados en este documento significan al menos dos nucleótidos unidos covalentemente juntos. Los oligonucleótidos típicamente son de aproximadamente 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 40, 50 o hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos y polinucleótidos son polímeros de cualquier longitud, incluyendo longitudes más largas, por ejemplo, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10 000, etc. Un ácido nucleico de la presente invención generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener estructuras alternativas que comprenden, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato u O-metilfosforoamidita (véase, Eckstein, 1991) y estructuras y enlaces de ácido peptidonucleico. Pueden usarse mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos. Los análogos particularmente preferidos para los oligonucleótidos son ácidos peptidonucleicos (PNA).

35 Se entiende dentro del alcance de la invención que "PCR (reacción en cadena de la polimerasa)" se refiere a un método de producción de cantidades relativamente grandes de regiones específicas de ADN o uno o más subconjuntos del genoma, haciendo posible de ese modo diversos análisis que se basan en esas regiones.

Se entiende dentro del alcance de la invención que "cebador de PCR" se refiere a fragmentos relativamente cortos de ADN monocatenario usados en la amplificación por PCR de regiones específicas de ADN.

40 Como se usa en este documento, la expresión "fenotipo" o "rasgo fenotípico" se refiere al aspecto u otra característica detectable de un individuo, producido por la interacción de su genoma, proteoma y/o metaboloma con el entorno.

Una "planta" es cualquier planta en cualquier fase de desarrollo, en particular, una planta seminal.

45 Una "célula vegetal" es una unidad estructural y fisiológica de una planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede estar en forma de una única célula aislada o de una célula cultivada, o formar parte de una unidad con una organización superior tal como, por ejemplo, un tejido vegetal, un órgano vegetal o una planta entera.

50 El "cultivo de células vegetales" significa cultivos de unidades vegetales tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivo celular, células en tejidos vegetales, polen, tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diferentes fases de desarrollo.

Como se usa en este documento, la expresión "parte de una planta" se refiere a una parte de una planta, incluyendo células individuales y tejidos celulares tales como células vegetales que están intactas en plantas, grupos celulares y cultivos tisulares a partir de los cuales pueden regenerarse las plantas. Los ejemplos de partes de plantas incluyen,

aunque sin limitación, células individuales y tejidos de polen, óvulos, hojas, embriones, raíces, puntas radiculares, anteras, flores, frutos, tallos, brotes y semillas; así como retoños, rizomas, protoplastos, callos y similares.

5 "Tejido vegetal", como se usa en este documento, se refiere a un grupo de células vegetales organizadas en una unidad estructural y funcional. Se incluye cualquier tejido de una planta en la planta o en cultivo. Esta expresión incluye, aunque sin limitación, plantas enteras, órganos vegetales, semillas de plantas, cultivo tisular y cualquier grupo de células vegetales organizadas en unidades estructurales y/o funcionales. El uso de esta expresión junto con, o en ausencia de, cualquier tipo específico de tejido vegetal, como los enumerados anteriormente o que esté contemplado de otra manera por esta definición, no pretende ser exclusivo de ningún otro tipo de tejido vegetal.

10 Se entiende dentro del alcance de la invención que "polimorfismo" se refiere a la presencia en una población de dos o más formas diferentes de un gen, marcador genético o rasgo hereditario o un producto génico obtenible, por ejemplo, a través de corte y empalme alternativo, metilación del ADN, etc.

Como se usa en este documento, el término "población" significa un conjunto genéticamente heterogéneo de plantas que comparten una derivación genética común.

15 La expresión "sonda" o "sonda de hibridación", como se usa en este documento define un segmento de ácido nucleico (o segmento de análogo nucleotídico, por ejemplo, polinucleótido como se define en este documento) que puede usarse para identificar una secuencia polinucleotídica específica presente en muestras. El segmento de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia polinucleotídica específica a identificar por hibridación. "Sondas" o "sondas de hibridación", como se usa en este documento, son ácidos nucleicos que pueden unirse de una manera específica de bases a una hebra de ácido nucleico complementaria. 20 Dichas sondas incluyen ácidos peptidonucleicos, como se describe en Nielsen *et al.* (1991). Las hibridaciones habitualmente se realizan en "condiciones rigurosas", como se define en este documento.

Como se usa en este documento, el término "descendencia" se refiere al descendiente o descendientes de un cruce particular. Típicamente, la descendencia resulta de la reproducción de dos individuos, aunque algunas especies (particularmente algunas plantas y animales hermafroditas) pueden autopolinizarse (es decir, la misma planta actúa como donadora de gametos tanto masculinos como femeninos). El descendiente o los descendientes pueden ser, por ejemplo, de la generación F1, la generación F2 o cualquier generación posterior. 25

La expresión "planta de tomate destinataria" o "planta de pimiento destinataria" se usa en este documento para indicar una planta que tiene que recibir ADN obtenido de una planta donadora que comprende un QTL para la modulación de la maduración de los frutos. Dicha "planta destinataria" puede comprender ya o no uno o más QTL para la modulación de la maduración de los frutos, en cuyo caso la expresión indica una planta que tiene que recibir un QTL adicional. 30

La expresión "fondo genético natural" se usa en este documento para indicar el fondo genético original de un QTL. Dicho fondo puede ser, por ejemplo, el genoma de una incorporación de tomate silvestre.

En esta solicitud, se entiende que un "evento de recombinación" significa un cruce meiótico.

35 "Homología de secuencia" o "identidad de secuencia" se usa en este documento indistintamente. Las expresiones "idéntico" o "porcentaje de identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o proteína, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácido o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o por inspección visual, si dos 40 secuencias que tienen que compararse entre sí difieren en la longitud, la identidad de secuencia se refiere preferiblemente al porcentaje de los restos nucleotídicos de la secuencia más corta que son idénticos a los restos nucleotídicos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia puede determinarse de forma convencional con el uso de programas informáticos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) para encontrar el segmento que tiene la máxima 45 identidad de secuencia entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit u otro programa de alineación de secuencia para determinar si una secuencia en particular tiene, por ejemplo, un 95% de identidad con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferiblemente de manera que el porcentaje de identidad se calcule para la longitud total de la secuencia de referencia y que se permitan brechas de homología de hasta un 5% del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se usa Bestfit, los denominados 50 parámetros opcionales se dejan en sus valores preestablecidos ("por defecto"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia dada y las secuencias descritas anteriormente de la invención pueden estar causadas, por ejemplo, por adición, eliminación, sustitución, inserción o recombinación. Dicha comparación de secuencias también puede realizarse preferiblemente con el programa fasta20u66" (versión 2.0u65, septiembre de 55 1998 por William R. Pearson y la University of Virginia; véase también W. R. Pearson (1990), ejemplos adjuntos y <http://workbench.sdsc.edu/>). Para este fin, se usan los ajustes de parámetros "por defecto".

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas. La expresión "que hibrida específicamente con" se refiere a la unión,

formación de dúplex o hibridación de una molécula únicamente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja de ADN o ARN (por ejemplo, celular total). La expresión "que se une o unen sustancialmente a" se refiere a la hibridación complementaria entre un ácido nucleico que actúa como sonda y un ácido nucleico diana, y abarca las faltas de coincidencia de poca importancia que pueden ajustarse reduciendo la rigurosidad del medio de hibridación para alcanzar la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana.

Un "polimorfismo mononucleotídico" (SNP) es una variación de secuencia de ADN que se produce cuando un único nucleótido A, C, G, T en el genoma (u otras secuencias compartidas como ADN mitocondrial) difiere entre un conjunto de cromosomas (por pares) de un individuo o difiere entre miembros de una especie.

La expresión "condiciones de invernadero convencionales" y "condiciones convencionales" se refieren a las condiciones de luz, humedad, temperatura, etc. en las que se cultivan o incuban las plantas, por ejemplo, con fines de caracterización fenotípica de la maduración de los frutos, que es convencional. Más en general, las expresiones se refieren a condiciones de crecimiento convencionales y de referencia con un fotoperiodo de 16 h (flujo de fotones fotosintéticos (PPF) 50 a 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), preferiblemente un régimen de 8 horas de oscuridad, una temperatura del aire de aproximadamente 20°C durante el día y 18°C en la noche, un déficit de presión de vapor de agua de aproximadamente 4,4 g  $\text{m}^{-3}$  correspondiente a una humedad relativa (RH) de aproximadamente un 60%-85%, a concentración de oxígeno atmosférica y a presión de aire atmosférica (generalmente 1008 hPa). El agua y los nutrientes pueden proporcionarse por goteo cerca del tallo, o en forma de pulverización o bruma.

Las "condiciones de hibridación rigurosas" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosas", en el contexto de los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, tales como las hibridaciones de Southern y Northern, dependen de la secuencia y son diferentes para parámetros ambientales distintos. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Se encuentran directrices amplias sobre la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes* parte 1 capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, Nueva York. En general, se seleccionan condiciones de lavado y de hibridación altamente rigurosas para que sean aproximadamente 5°C más bajas que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos. Normalmente, en "condiciones rigurosas" hibridará una sonda con su subsecuencia diana, pero no con otras secuencias.

La  $T_m$  es la temperatura (a un pH y una fuerza iónica definidos) en la que el 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean iguales a la  $T_m$  para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios en un filtro en una transferencia de Southern o Northern es formamida al 50% con 1 mg de heparina a 42°C, realizándose la hibridación durante una noche. Un ejemplo de condiciones de lavado muy rigurosas es NaCl 0,15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado con SSC 0,2x a 65°C durante 15 minutos (véase, Sambrook, *infra*, para una descripción del tampón SSC). A menudo, un lavado de rigurosidad alta va precedido por un lavado de rigurosidad baja para eliminar la señal de fondo de la sonda. Un ejemplo de lavado de rigurosidad media para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 1x a 45°C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado de baja rigurosidad para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 4-6x a 40°C durante 15 minutos. Para sondas cortas (por ejemplo de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones rigurosas típicamente implican concentraciones salinas de menos de aproximadamente 1,0 M de concentración de iones Na, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de iones Na (u otras sales) a pH 7,0 hasta 8,3 y la temperatura típicamente es de al menos aproximadamente 30°C. Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. En general, una relación de señal a ruido de 2 veces (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto sucede, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético.

Como se usa en este documento, el término "tomate" preferiblemente significa *Solanum lycopersicum* pero también puede significar cualquier planta, línea o población antiguamente conocida en el nombre de género de *Lycopersicon* incluyendo, aunque sin limitación *L. cerasiforme*, *L. cheesmanii*, *L. chilense*, *L. chmielewskii*, *L. esculentum* (ahora *S. pennellii*), *L. hirsutum*, *L. parviflorum*, *L. pennellii*, *L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium* o *S. lycopersicoides*. El nombre científico recién propuesto para *L. esculentum* es *S. pennellii*. Asimismo, los nombres de las especies silvestres pueden alterarse. *L. pennellii* se ha convertido en *S. pennellii*, *L. hirsutum* puede convertirse en *S. habrochaites*, *L. peruvianum* puede dividirse en *S. 'N peruvianum'* y *S. 'Callejon de Huayles'*, *S. peruvianum*, y *S. corneliomuelleri*, *L. parviflorum* puede convertirse en *S. neorickii*, *L. chmielewskii* puede convertirse en *S. chmielewskii*, *L. chilense* puede convertirse en *S. chilense*, *L. cheesmaniae* puede convertirse en *S. cheesmaniae* o *S. galapagense*, y *L. pimpinellifolium* puede convertirse en *S. pimpinellifolium* (Knapp (2005)).

Se entiende dentro del alcance de la invención que "rasgo" se refiere a una característica o fenotipo, por ejemplo, modulación de la maduración de los frutos. Un rasgo puede heredarse de una manera dominante o recesiva, o puede ser monogénico o poligénico.

5 Se entiende dentro del alcance de la invención que "dominante" se refiere a un alelo que determina el fenotipo cuando está presente en estado heterocigótico u homocigótico.

Un alelo "recesivo" se presenta únicamente cuando está presente en estado homocigótico.

Se entiende dentro del alcance de la invención que "isogénico" se refiere a plantas cultivadas que son genéticamente idénticas, excepto que pueden diferir por la presencia o ausencia de una secuencia de ADN heteróloga.

10 Se entiende dentro del alcance de la invención que "fase de recolección" significa la fecha de recolección, es decir, la fecha en que se retira el fruto de la planta.

"Estado de color inmaduro" con respecto al pimiento se define como el color inicial desarrollado cuando el fruto ha alcanzado el tamaño completo. En pimiento, el color inmaduro se define como el color antes del estado de irrupción.

15 "Color maduro" en pimiento es el color que finalmente desarrolla el fruto. El pimiento pasa a través de colores intermedios que son iguales al estado de irrupción en tomate (véase a continuación).

"Estado de irrupción" en pimiento es cuando el color empieza a cambiar desde el color inmaduro.

"Estado de maduración" en pimiento es cuando el pimiento alcanza su color final.

"Estado verde inmaduro" con respecto a tomates se define cuando los frutos están inmaduros y aún están creciendo en tamaño. Se entiende que este estado es el primer estado en el proceso de maduración.

20 "Estado verde maduro" con respecto a tomates se define cuando el fruto está desarrollado completamente expandido, pero inmaduro y sigue el "estado verde inmaduro" en el proceso de maduración. Los tomates verdes maduros tienen una "estrella" blanca a amarilla en el extremo de la flor. Los tomates tradicionales recogidos en el estado verde maduro son los más adecuados para el mercado de productos frescos comerciales porque toleran la manipulación tosca mejor que los estados de maduración y mantienen su forma el máximo tiempo en  
25 almacenamiento, transporte y en el estante del supermercado; sin embargo, de alguna manera carecen de aroma y sabor completo.

30 "Estado de irrupción" con respecto a los tomates se define como el primer signo de color rojo en el fruto, típicamente se produce en 24 horas desde el estado verde maduro. Los tomates que se recolectan en el "estado de irrupción" habitualmente tienen mejor aroma y sabor pero tienen firmeza reducida y son ligeramente menos adecuados para la manipulación, envase y transporte que los tomates en el estado verde maduro.

"Estado de maduración rojo" con respecto a los tomates se define cuando los frutos están completamente rojos, sin signos de color verde. Estos frutos han alcanzado su óptimo en sabor y aroma, pero no pueden transportarse a causa de su ausencia de firmeza y no toleran mucha manipulación.

35 Se entiende dentro del alcance de la invención que "elemento genético" y "elemento genético o parte del mismo" significan un gen o parte del mismo que puede contribuir a la firmeza de los frutos de la planta influyendo en la expresión del rasgo de firmeza al nivel del propio ADN, al nivel de la traducción, transcripción y/o activación de un producto polipeptídico final, es decir, para regular el metabolismo en la pulpa del tomate que da lugar a la expresión fenotípica del genotipo.

40 Se entiende dentro del alcance de la invención que "pericarpio interior" y "pericarpio exterior" significan el tejido del fruto donde el pericarpio exterior es la capa (aproximadamente 2 mm) inmediatamente por debajo de la epidermis exterior y por encima de la capa de tejido vascular. El pericarpio interior es de 3 mm hasta 10 mm por debajo de la capa vascular y antes de la epidermis interior.

45 Se entiende dentro del alcance de la invención que "brecha de recolección" significa el periodo de tiempo desde la fase de recolección hasta cuando el fruto está demasiado maduro para recolectarse con fines de escala comercial. Típicamente, la brecha de recolección empieza en el estado verde maduro y continua hasta el estado de irrupción más dos a cinco días, dependiendo de la variedad de cultivo y las condiciones ambientales.

50 Se entienden dentro del alcance de la invención que "ligado a" y "caracterizado por" o "asociado con" al menos uno de los marcadores de ADN de la presente invención significan una secuencia de ADN que está genéticamente ligada al gen de interés responsable de la modulación del rasgo de maduración de los frutos y donde una secuencia marcadora específica está ligada a un alelo particular de ese gen. Cuando se dice que dos marcadores/secuencias están ligadas genéticamente, la frecuencia de recombinación entre los dos marcadores/secuencias es baja y puede esperarse que estos dos marcadores/secuencias se hereden conjuntamente. Para la población de plantas descrita en este documento, los marcadores denominados como ligados a los QTL están a una distancia de 1 cM o menos

de separación. Los marcadores que están separados por una distancia de 1 cM entre sí tienen una probabilidad de un 1% de separarse entre sí debido a un evento de recombinación en una única generación.

5 Se entiende dentro del alcance de la invención que "aumento" o "disminución" en la maduración de los frutos significa un fruto que tiene un índice de color aumentado/disminuido (por ejemplo, como se describe en la sección de ejemplos), o una textura del fruto aumentada/disminuida estadísticamente significativa a  $P < 0,05$  o  $P < 0,01$  en comparación con un fruto de una planta no transformada de control.

La carga máxima se define como el valor que representa la carga mayor (en Newton (N)) requerida para causar el fallo de la integridad tisular.

10 Se entiende dentro del alcance de la invención que "planta de tomate de control" o "planta de pimiento de control" significa una planta que tiene el mismo fondo genético que la planta cultivada de la presente invención, donde la planta de control no sobreexpresa los elementos genéticos - o parte de los mismos - de la presente invención ligados a la modulación de la maduración de los frutos. En particular, una planta de control es una planta que pertenece a la misma variedad de planta que la planta transformada. La planta de control se cultiva durante el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones que la planta cultivada de la presente invención. La variedad en este documento se entiende de acuerdo con la definición de UPOV. Por tanto, una planta de control puede ser una línea endogámica o un híbrido con la condición de que tengan el mismo fondo genético que la planta de la presente invención excepto que la planta de control no sobreexpresa el elemento genético - o parte del mismo - de la presente invención ligado a la modulación de la maduración de los frutos.

20 Se entiende dentro del alcance de la invención que "antesis" significa el periodo durante el que la flor está completamente abierta y se libera polen.

Se entiende dentro del alcance de la invención que "alimento procesado" significa alimento que se ha alterado de su estado natural. Los métodos usados para procesar alimentos incluyen, aunque sin limitación, enlatado, congelación, refrigeración, deshidratación y procesamiento aséptico.

25 Se entiende dentro del alcance de la invención que "mercado de productos frescos" significa hortalizas en el mercado que se han procesado mínimamente.

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar en mayor grado algunas realizaciones de la invención. Sin embargo, no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del amplio alcance de la invención.

### Ejemplo 1

#### 30 Identificación de genes de tomate e inferencia de redes

El gen Le005930\_at (en este documento también mencionado como APRR2 de tomate o de tipo APRR2 de tomate) se identificó como resultado de un análisis de redes neurales en el conjunto de datos de matriz de tomate. Se prepararon muestras de ARN de Ailsa Craig de tipo silvestre y alelos mutantes nor, rin y Cnr en un fondo Ailsa Craig en diferentes fases del desarrollo de los frutos de tomate. La maduración se realizó de acuerdo con métodos convencionales. Los valores de expresión de Le005930\_at se obtuvieron usando el genochip de tomate 23k Affymetrix personalizado de Syngenta. Los datos de la micromatriz se normalizaron en el entorno estadístico R por el método de RMA (Irizarry *et al.* 2003) disponible en el paquete affy Bioconductor (Gautier *et al.* 2004) que se ejecuta mediante el paquete affymGUI (Smyth 2005).

40 Se seleccionaron factores de transcripción para análisis posterior. Se encontró que Le005930\_at tenía un perfil de expresión específico de maduración que aumenta drásticamente entre 40 dpa y 49 dpa (figura 1a) que corresponde con el primer aspecto o coloración roja. Este aumento no estaba presente en ninguna de las 3 líneas mutantes (figura 1a-c), donde la expresión nunca alcanzaba los niveles observados en el tipo silvestre. El análisis de redes neurales artificiales (ANN) se realizó en 2 puntos temporales de datos (40 dpa and 54 dpa). Se detectó Le005930\_at como un núcleo.

45 Se midieron los cambios de expresión génica en las que sobreexpresaban Le005930. El análisis de la serie de desarrollo completa en los estados de crecimiento verde maduro (MG) y de irrupción (B) frente a los frutos de tipo silvestre en los mismos estados reveló que una gran cantidad de genes estaban regulados por aumento y disminución en las líneas transgénicas. De los genes regulados por aumento muchos están relacionados con la maduración de los frutos, pero se expresaban antes en las líneas de sobreexpresión. Por ejemplo, en el estado MG LeEXP1 tiene una expresión casi 20 veces mayor y la poligalacturonasa 10 veces mayor que en MG WT. La expresión del factor de transcripción NOR es 19 veces mayor que MG WT. Los genes que codifican enzimas de la pared celular que se expresan normalmente en su nivel máximo en frutos verdes maduros, por ejemplo, algunos miembros de la familia de xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa (Solyc02g091920, XTH7) muestran expresión reducida en transgénicos MG en comparación con el tipo silvestre. Estos datos indican que la regulación por

aumento del gen de tipo APRR2 del cromosoma 8 en tomate induce de forma masiva la expresión de genes relacionados con la maduración.

Tabla 1

ID Sol	Nota	Expresión factorial diferencial en la de sobreexpresión (log FC)	Comentarios respecto a la maduración normal
Solyc04g071650	Celulosa sintasa	-1,78468	Máxima en verde maduro
Solyc07g052980	XTH16	-1,94747	Máxima en verde maduro
Solyc03g093080	XTH3 y 4 copias en la misma región	-2,06438	Máxima irrupción y maduración roja
Solyc02g088100	LeEXP5	-2,17115	Máxima en verde maduro
Solyc10g005960	FLA	-2,1184	Máxima en verde maduro
Solyc02g091920	XTH7	-3,28676	Máxima en verde maduro

5 Globalmente, los datos de la matriz muestran que muchos genes que normalmente están asociados positivamente con la maduración están regulados por aumento en la sobreexpresora del gen APRR2 de tomate muy temprano (es decir, en el estado verde maduro) o en algunos casos los genes que están regulados por disminución en el estado verde maduro parecen suprimirse en el estado verde maduro hasta un grado mayor en la sobreexpresora. Por ejemplo, NOR que normalmente se expresa poco en verde maduro se fuerza en la sobreexpresora. Esta es una evidencia muy fuerte de que el gen APRR2 de tomate fuerza la maduración temprana cuando se sobreexpresa.

**Ejemplo 2**

**Información de la secuencia del gen de tipo APRR2 de tomate**

15 La secuencia de la sonda de Le005930 fue idéntica a SGN Unigene SGN-U585565. El gen representado por Le005930 se identificó como muy estrechamente relacionado con un regulador de respuesta de dos componentes - de tipo APRR2 de *Arabidopsis thaliana*.

**Ejemplo 3**

**Generación de plantas transgénicas de tomate**

*Construcción y detalles del vector*

20 Se generaron construcciones para que sobreexpresaran y regularan por disminución este gen relacionado con APRR2. La secuencia de las construcciones de sobreexpresión e iARN se proporcionan es la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3, respectivamente.

SEQ ID NO: 1 -

25 GACCCACCTAACTATAATCAACAAACGACCCTTAAAAGAAGAAGAAAAACAAGAACAGATGAGCTAAGTCTTCT  
 TCATTTCCCAAGAGATACAGGATTGAATAGTTAATGACTGATTAATAAAGTGACCGAGTTGGAGGGACTAAAAAGG  
 ATGCCTTTTTAGAAATGATTTGCATTGAGAATGAATATTGGGTTGGAAAGATTTCCCAAAGGGCTTAAAGTCCT  
 ACTTCTTGATGAAGATAGCAACTCTGCTGCTGAGATGAAATCAAGGCTTGAGAAAATGGACTACATAGTCTACTC  
 GTTCTGCAACGAGAGCGAAGCTTTGACTGCAATCTCAAGCAAATCCGAGGGCTTTTCATGTTGCCATTGTGGAGG  
 TAAGTGCAGGCAACAGTGATGGGGTTCTACGGTTTCTTAAAGTGCCAAAGATCTACCAACTATAATGACATCAA  
 30 ATATACATTCTCTTAGTACCATGATGAAATGTATTGCGCTAGGCGCAGTTGAGTTCTTCAGAAACCATTGTCAGA  
 TGATAAACTCAAAAATATATGGCAGCATGTAGTTCACAAGGCATTCAATACTAGAAAAGGATGTGTCCAAATCACTT  
 GAGCCGGTAAAAGATTCTGTCCTCTCGATGCTGCAGTTACAAGTAAATGGGTGAAGCAGATGACAAAAGTTC  
 AAATGGAACAGAACCTCCCCTGCGAGTAGCGGAAAGCAATACTGAACAGTCATCGGGCTGTGATAAAATACCCTG  
 CTCCCTCAACCCACAATTGAAACAAGGAGTCCGATCCGTCGATGATGGTACTGCCATGATCATACTATCTTCT  
 CAACTGACCAAGACAGTGGGGAACATGATGCTGACACTAAATCCGTCGAACTACTTATAACAATCACTTGCTG  
 35 AGAATAATGTCCAAACAAGTCCTACTGTACAGCAAGGAGATATTATTTGAAAGAGGATAATGTTTCATCTCCTGA

TCTAAAGACGGAGACTGATATCGCTACCACTTCACGAAGTAACGACTGCCCTGACAATAGCATTATGCATTCTGC  
 TGAACCTAGTAAAGCATCTGGTCCTCATAGTTCAAATGGGACTAAATCCAATAGGAAGAAGATAAAGGTAGATTG  
 GACACCTGAACTACACAAGAAGTTTGTTCAGCAGTAGAGCAACTCGGTATAGATCAAGCCATTCCTTCTCGAAT  
 ACTGGACCTGATGAAAGTAGAGGGCTTAACGAGACATAACGTAGCTAGCCATCTCCAGAAATACAGAATGCATC  
 5 GAAAGCAAATTTTGCCAAAGGAAGTAGAAAGAAGATGGCCTAATCCGCAACCAATAGATTGAGTCCAAAGAAGTT  
 ACTATCCTCATAAACCTATCATGACATCCCACAATATCATTCTAATCATGTTGCCCCAGGTGGTCAGTTCTATCC  
 TGCTTGGGTAACACCAGCAAGTTATCCGAACGGTTTACAAGTGTGGGGTTCACCTTACTATCCGGGATGGAAC  
 CTGCAGAGACTTGGCACTGGACGCCTCGTCCAGAGCTGCATGCTGATACATGGGGCTCCCCTATCATGTCACC  
 10 GTCGCTTGGATCATATCCACCATATCCTCAGAATGCTGGAGTGTACCGCCACATGGAACACATAACAGATATAG  
 CATGCTAGAGAAGTCGTTTGTATCTTCAACCGCGGATGAGGTGATTGATAAAGTAGTAAAGAGGCAATAACCA  
 AACCATGGTTACCACTTCCTTTGGGCCTAAAAGCTCCTTCAACGGAGAGCGTTCTTGACGAACCTTCTAGACAAG  
 GGATCTCAACCATTCTTCAAAAATCAACGACTCCCGTTGTCGGAGATGAGATGACATGTCATTCTAATTTTTTTT  
 GGGTCCCATAGTTGGTGCATGTCAAAAAAAAAATAATCTCCAATTACTTGATGGACATGTACCATGACATTA  
 CCCAGTACCCCGAGTGCACCCACGCGTATGGCATTGACTCGACGGTCAAAAATCGAGTTGTTGTAATAATGGACC  
 15 CAAATATGGGTTTTCCCTTTTTTGTGGCCCAATTTAGATGTTTGGCCGATGAGTGTGCTCCATT

SEQ ID NO: 3 -

CACAATATCATTCTAATCATGTTGCCCCAGGTGGTCAGTTCTATCCTGCTTGGGTAACACCAGCAAGTTATCCGA  
 ACGGTTTACAAGTGTGGGGTTCACCTTACTATCCGGGATGGAACCTGCAGAGACTTGGCACTGGACGCCTCGT  
 20 CCAGAGCTGCATGCTGATACATGGGGCTCCCCTATCATGTCACCGTTCGCTTGGATCATATCCACCATATCCTCA  
 GAATGCTGGAGTGTACCGGCCACATGGAACACATAACAGATATAGCATGCTAGAGAAGTCGTTTATCTTACC  
 CGGCGGATGAGGTGATTGATAAAGTAGTA

El vector de sobreexpresión usado fue pGWB405 (Nakagawa T, Suzuki T, Murata S *et al.* Improved Gateway Binary  
 Vectors: High- performance Vectors for CREATION of Fusion Constructs in Transgenic Analysis of Plants.  
 Bioscience biotechnology Biochemistry, 71(8)2095-2010, 2007). Para la producción de sobreexpresión, se clonaron  
 25 2090 pb de la secuencia de Le005930 correspondiente a la fase de lectura abierta completa delante del promotor  
 35S de CaMV usando el sistema de clon Gateway que evita la necesidad de sitios de restricción. La secuencia attB1  
 (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT) (SEQ ID NO: 4) y attB2  
 (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT) (SEQ ID NO: 5) se añadió al extremo 5' de cebadores directos  
 e inversos por separado. La construcción también contenía el terminador de CaMV en el extremo opuesto. Para la  
 30 producción de la construcción de iARN, se clonó un fragmento de 326 pb de la secuencia codificante 3' única para el  
 gen Le005930 en el vector de iARN del sistema Gateway pK7GWIWG2(I). El fragmento de 326 pb de la secuencia  
 codificante 3' usado en este ejemplo empieza desde CACAATATCATTCTAATCAT y finaliza con  
 AGGTGATTGATAAAGTAGTA.

#### Transformación genética de tomate (Micro-Tom)

35 Se obtuvieron semillas de tomate Micro-Tom del Dr. Andrew Thompson, Warwick HRI, RU. Estas semillas de tomate  
 también están disponibles al público del Tomato Genetics Resource Centre, Davis, California. Las semillas se  
 esterilizaron durante 30 s en etanol al 70%, se aclararon 3 veces en agua estéril seguida por 10 minutos en lejía al  
 50% y se aclararon con agua estéril 5-7 veces. Las semillas (50-100 semillas) después se sembraron en medio  
 1/2 MS y se dejaron durante 7/8 días en una cámara de cultivo a 25°C.

40 En el día antes de la transformación (D - 1), el cultivo *Agrobacterium* se generó de la siguiente manera: Se  
 inocularon 10 ml de LB líquido + antibióticos dependiendo de la resistencia a plásmidos/bacterias con una colonia  
 bacteriana o solución madre de glicerol, seguido por incubación durante 24 h a 48 h a 28°C con agitación  
 (250 r.p.m.). Los cotiledones se prepararon el mismo día cortándolos en ambos extremos y poniéndolos  
 45 temporalmente en KCMS. Los cotiledones cortados entonces se recuperaron y se depositaron sobre placas de Petri  
 de KCMS sólido (cara superior sobre el medio). Las placas de Petri entonces se colocaron en la oscuridad a 25°C en  
 una cámara de cultivo durante 24 h.

En el día de la transformación (día D), se centrifugó la suspensión de *Agrobacterium* durante 10 min a 3000 r.p.m. El  
 sedimento bacteriano entonces se resuspendió en KCMS líquido hasta una densidad óptica cercana a 1. El cultivo  
 entonces se diluyó en un tubo Falcon estéril hasta una densidad óptica entre 0,05 y 0,08 (volumen final de 30 ml).  
 50 Para la transformación, los cotiledones se recogieron de la placa de KCMS y se impregnaron en la suspensión  
 bacteriana (0,05-0,08 DO) durante 30 min con agitación. Los cotiledones entonces se secaron en papel Whatman  
 estéril (Kleenex estéril) y se depositaron de nuevo sobre la placa de Petri con KCMS sólido. Las placas de Petri se  
 incubaron en la oscuridad durante 48 h en cámara de cultivo a 25°C.

Dos días después de la transformación (día D+2), los cotiledones se depositaron sobre medio 2Z con 400 mg/l de  
 Augmentin (Co-amoxiclav) + kanamicina 75 mg/l durante 15 días para la regeneración de las plántulas. El medio se  
 55 cambió cada 15 días o más frecuentemente en caso de contaminación. Habitualmente, la concentración de  
 Augmentin se redujo hasta 200 mg/l (o hasta 400 mg/l en el caso de desarrollo de *Agrobacterium*). Se seleccionaron  
 38 plantas transgénicas independientes por kanamicina. Cuando las plántulas estaban bien desarrolladas, se  
 picaron en medio de enraizamiento hasta su aclimatación en el invernadero.



Componentes de medio

Tabla 1

	KCMS líquido	KCMS sólido	2Z	Medio de enraizamiento	MS 1/2
Volumen	1l	1l	1l	1l	1l
MS (sal basal, Duchefa MO221)				2,2 g	
MS (incluyendo vitaminas, Duchefa, MO222)	4.4 g	4.4 g	4.4 g		2.2 g
Sacarosa	20 g	20 g	30 g	10 g	15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg.	200 mg.			
pH	5,8	5,7	5,8	5,8	5,9
Agar		8 g	8 g	7 g	8 g
	Autoclave	Autoclave	Autoclave	Autoclave	Autoclave
Tiamina	0,9 mg/l	0,9 mg/l			
Acetosiringona	100 µM	100 µM			
2.4D	200 µg/l				
Kinetina	100 µg/l				
Vitaminas R3					500 µl
Vitaminas Nitsch x1000			1 ml	1 ml	
Ribósido de ceatina			2 mg/l		
IAA			0,87 mg/l		
Kanamicina			75 mg/l	50 mg/l	
Augmentin			400 mg/l después 200 mg/l	200 mg/l	

- 5 La composición de las vitaminas R3 fue la siguiente: tiamina 1 g/l, ácido nicotínico 0,5 g/l y piridoxina 0,5 g/l. La composición de las vitaminas Nitsch fue la siguiente: biotina 0,05 mg/l, ácido fólico 0,5 mg/l, glicina 2 mg/l, mioinositol 100 mg/l, ácido nicotínico 5 mg/l, piridoxina HCl 0,5 mg/l y tiamina HCl 0,5 mg/l.

- 10 Las inserción de ADN-T en el genoma de la planta Micro-Tom se confirmó por análisis de PCR para la presencia del gen npt II, que confiere resistencia a kanamicina durante cultivo tisular (datos no mostrados). El análisis de PCR se realizó usando un kit de PCR directo en plantas Phire® con los cebadores npt II-directo (5'-CACCATGATATTCGGCAAGCAG-3') (SEQ ID NO: 6) y npt II-inverso (5'- TGTGCTCGACGTTGTCAGTAA-3') (SEQ ID NO: 7) usando los siguientes componentes y condiciones:

Mezcla maestra Phusion® 2x                      10 µl  
 5930-5F(10 µmol/l)                                  0,5 µl  
 5930-5R(10 µmol/l)                                  0,5 µl

- 15 ADN polimerasa de inicio en caliente Phire®0,4 µl

Muestras foliares 0,5 mm

ddH<sub>2</sub>O Hasta 20 µl

98°C 5 min

98°C 5 s

5 60°C 5 s

72°C 20 s

40 ciclos

72°C 1 min

#### Ejemplo 4

#### 10 Análisis de qPCR en tomate

Se midió la expresión de Le005930 respecto a un gen constitutivo, en este caso un factor de elongación (número de acceso a GenBank: X14449). El análisis de qPCR se realizó sobre frutos de tipo silvestre (Alisa Craig) y transgénicos (tomate grande). El gen constitutivo *LeELF-α* se usó como control (número de acceso a GenBank: X14449). Se usaron los siguientes cebadores en el análisis de los niveles de *LeELF-α* y Le5930:

15 LeELF-F: 5'-ACCTTTGCTGAATACCCTCCATTG-3' (SEQ ID NO: 8)

LeELF-R: 5'-CACACTTCACTTCCCCTTCTTCTG-3' (SEQ ID NO: 9)

LeELF-sonda: (FAM)5'-TCGTTTTGCTGTGAGGGACATGAGGCA-3'(TAMARA) (SEQ ID NO: 10)

5930-Q-F: 5'-TTGCCCCAGGTGGTCAGTTCTAT -3' (SEQ ID NO: 11)

5930-Q-R: 5'-CAGTGCCAAGTCTCTGCAGGTTT -3' (SEQ ID NO: 12)

20 5930-Q-sonda:(FAM)5'-ATCCGAACGGTTTACAAGTGTGGGGTT-3' (TAMARA) (SEQ ID NO: 13)

Componentes de reacción y condiciones:

Mezcla maestra de PCR Universal Taqman 2x 7,5 µl

Cebador-F (10 µmol/l) 0,45 µl

Cebador-R (10 µmol/l) 0,45 µl

25 Sonda (10 µmol/l) 0,3 µl

ADNc 5,0 µl

Agua (calidad molecular) 1,3 µl

Volumen final 15 µl

95°C 10 min

30 95°C 10 s

60°C 50 s

72°C 1 s

45 ciclos

40°C 10 min

35 Estos resultados demuestran que el gen Le005930 tenía una expresión significativamente aumentada en comparación con WT en las 3 líneas transgénicas seleccionadas en el estado verde inmaduro, verde maduro y de irrupción de desarrollo de los frutos.

#### Ejemplo 5

#### Mediciones del índice de color de tomate

Las mediciones del índice de color de tomate (TCI) se hicieron usando una máquina de medición de color MINOLTA para obtener 3 parámetros de color L, a y b. Para calcular el TCI se usó la siguiente fórmula:  $(2000 a)/(L*(a^2 + b^2)^{0,5})$ . Los resultados de TCI muestran que el color del fruto de plantas que sobreexpresan Le005930 era significativamente más oscuro que los frutos de tipo silvestre en el estado de crecimiento inmaduro (figura 3). Esto puede visualizarse en un experimento diferente que compara la línea TP232 que sobreexpresa Le005930 frente a tomate de tipo silvestre en diferentes estados de crecimiento (figura 7).

### Ejemplo 6

#### Ensayo de textura del tomate

Los ensayos de textura se realizaron usando una máquina de ensayo de textura Stable MicroSystems. Se permitió que una sonda de diámetro de 2 mm entrara en contacto con la superficie del fruto a 5 mm/s y se registró la fuerza requerida para aplastar la superficie del fruto 2 mm. Los resultados mostraron que los frutos que sobreexpresan Le005930 tenían un fenotipo de textura coherente con tener propiedades mejoradas de maduración (figura 4A). Por otro lado, los frutos de iARN que no expresaban Le005930 tenían una maduración disminuida (figura 4B).

### Ejemplo 7

#### Mediciones de clorofila en tomate

Para las mediciones de clorofila, se cortó una sección de la epidermis y el pericarpio de un área por encima de un lóculo en una tira de 5 mm de anchura alrededor del ecuador del fruto verde maduro y de maduración, se pesó y se molió en un mortero y mano de mortero con arena lavada con ácido (Sigma-Aldrich Company Ltd, RU) y unos pocos ml de hexano:acetona al 60:40%. El hexano:acetona se eliminó y se almacenó en un frasco de vidrio universal envuelto en lámina de aluminio y se reemplazó repetidamente con líquido nuevo hasta que ya no perdía color moliendo el fruto. Inmediatamente se midió la absorbancia óptica de las muestras en un espectrofotómetro de barrido Phillips PU 8720 y se calcularon los contenidos de clorofila y carotenoides con las siguientes ecuaciones:  $\text{clorofila total mg ml}_1 = 8,02(\text{DO663}) + 20,2(\text{DO645})$  y  $\text{carotenoide total mg ml}_1 = (\text{DO450})/0,25$  (Fray y Grierson, 1993). Se recogieron muestras tisulares individuales de 1-3 frutos para cada línea (Forth y Pyke, 2006). Los resultados muestran que las líneas que sobreexpresan Le005930 tienen más clorofila cuando están verdes maduras (TP229, TP232 y TP264) y que justifica el color más oscuro de las líneas de sobreexpresión - véase la figura 5, mientras que la línea de iARN (TP262) tiene mucho menos en comparación frutos de tipo silvestre (datos no mostrados).

### Ejemplo 8

#### Recuento de plastidios de frutos de tomate

Para obtener células individuales, se separaron células del pericarpio exterior e interior de frutos de tomate (secciones de  $1 \text{ mm}^2$ ) y se fijaron inmediatamente después de la escisión con una cuchilla de afeitar estéril en solución de glutaraldehído al 3,5% durante una hora en la oscuridad. Los frutos verdes se alteraron como se describe previamente y de la siguiente manera: Se trataron con calor a  $65^\circ\text{C}$  en una solución de ácido etilendiaminatetraacético de disodio (0,1 M, pH 9,0) durante hasta 20 min seguido por maceración con fórceps limpios sobre portaobjetos de microscopio de vidrio (Pyke y Leech, 1991). El pericarpio de frutos en maduración se alteró en una solución de ácido etilendiaminatetraacético de disodio (0,1 M, pH 9,0) a temperatura ambiente. El tejido se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  en solución de EDTA-Na2 durante hasta seis meses. Para el recuento de plastidios, se fijaron células individuales del pericarpio exterior o interior en el portaobjetos. El recuento de plastidios se hizo en microscopio Leica (CTR5000) con un objetivo 20X. El número de plastidios en el pericarpio exterior fue significativamente mayor en las líneas que sobreexpresan el gen Le005930 en comparación con el tipo silvestre ( $p < 0,001$ ).

### Ejemplo 9

#### Análisis del tamaño de cloroplastos en tomate

Se retiró una sección cortada a mano de  $1 \text{ cm}^3$  de grosor del punto central de cada fruto de pimiento cultivado en invernadero fresco. Cada sección se montó en agua en un portaobjetos de microscopio de vidrio y se cubrió con un cubreobjetos de vidrio. Los cloroplastos se visualizaron dentro de cada sección usando un microscopio confocal de barrido láser BioRad Radiance 2100. Se usaron los siguientes ajustes: línea de láser de iones de argón de 488 nm, energía del 50%, objetivo 40x, resolución  $1024 \times 1024$ , sin aumento, velocidad de barrido de 50 lps. Se tomaron imágenes de tres campos aleatorios de visión dentro de cada sección, es decir, se capturaron 3 campos de visión por fruto. Las imágenes se exportaron como TIF y se analizó el tamaño de los cloroplastos en Image J. Para las líneas tanto TP (de sobreexpresión) como WT (tipo silvestre), los cloroplastos ubicados en el pericarpio interior parecían mayores que los ubicados en el tejido del pericarpio exterior. No hubo diferencias de tamaño fácilmente observables entre los cloroplastos presentes en el pericarpio interior de líneas TP frente a WT. Los cloroplastos ubicados en los tejidos del pericarpio exterior de líneas TP parecían más grandes que los cloroplastos ubicados en los tejidos del pericarpio exterior de WT.

**Ejemplo 10**

**Perfil de expresión de transcritos génicos de pimiento**

Se obtuvo un progenitor de pimiento blanco de Paul Bosland, University of New Mexico. El progenitor de pimiento rojo se desarrolló de forma interna por Syngenta. Se realizó un experimento piloto usando secuencia de ARNm. Las muestras eran plantas de pimiento cultivadas en campo, y se combinaron muestras de 3 réplicas. Los resultados indican que la abundancia relativa de transcrito de ARNm de tipo APRR2 de pimiento es elevada en el estado inmaduro en el progenitor rojo, pero baja en el progenitor blanco en el mismo estado (figura 8a). También se midió la suma de todos los transcritos de proteína de unión a clorofila a/b. La suma de todos los detectados (28 en total) indica que la expresión de tipo APRR2 refleja la expresión de la maquinaria de clorofila. (Figura 8b).

**Ejemplo 11**

**Generación y análisis de una sustitución G-A responsable del truncamiento de la proteína en el gen de tipo APRR2 de pimiento**

Para encontrar el homólogo de APRR2 de pimiento, se usó una secuencia EST de tomate (SGN-U585565) para someter a BLAST una base de datos de EST de pimiento. El mejor acierto con homología de un 90% sobre 263 bases fue KS19056B05. Como este EST era únicamente una secuencia parcial y también parecía ser quimérico, se generó una sonda P32 a partir del extremo 3' de la secuencia EST usando los cebadores 5' GGTTTACAAGTGTGGGGTTCACC 3' (SEQ ID NO: 17) y 5' CATCGAATGACTTCTCTAGCATGCTA 3' (SEQ ID NO: 18) usando un kit de marcaje Amersham Rediprime II. Se hibridó un filtro de biblioteca BAC de *Capsicum frutescens* (cv BG2816) de Cornell University con la sonda usando protocolos de hibridación convencionales encontrados en el sitio web de Clemson University Genomics Institute. Se recuperó BAC 85L18 del tamiz de la biblioteca y se secuenció usando paseo de cebador con un secuenciador ABI3730XL.

La secuencia de APRR2 de pimiento de tipo silvestre genómica generada fue la siguiente (SEQ ID NO: 14):

>1553

TTTCCCCTAAAAAGATCTATTACATGGGGTTTTTCTGTTTTATGTTGG  
 TTCTTATTTAAAGCTGAAAATAGTCTTTGTCTCTTTCCTTTTTTGTTAGA  
 TGATGTTGAAGATTCAAGCTTGAAAAAGTGTGTCAGAAGGAGTGGGGGGG  
 GGGGGGGTTGATTTTTTTGTTTTATTTGAGACATGTAATATTATTATGA  
 GTGATATTTACTGTAAGGTTTAAGAGGGATTTTGCTAAAGGTTGAATTTT  
 TAATGTAAATCTGAGGGGAATTCCTTTTTGGATGTGCAGATTCAATTGGT  
 AATGACTGATTAAGTACTGTTTTTGGAGGCACTAATTTGGCTGACCTAA  
 AAAGGATGCCTTTTTAGAAATGATTTGCATTGAGGATGAATTATTGGGTT  
 GGAAAGATTTCCCAAAGGGGCTTAAAGTCCTCCTCCTTGATGAAGATAGC  
 AGCTCTGCTGCTGAGATGAAATCAAGGCTTGAGAAAATGGACTATATAGG  
 TAAGTAGTTGTAACCCAGTCTAAAAATACTTACTCGCACCCGGTGTTTAT  
 GTTTTTTTTTTTTCTTTTGGTTTTGCTCATTCTTTTGGTGTTCCTGTA  
 AAGTTGCTGCAATATGACTAGGAGGTCAGAAACAGCCTCTTGCTGAAATG  
 CAAGGTAAGGCTGCGTACAATAAACTCATGTAGTTCGACACTTTCCTATG  
 CATATCGGGAGTTTTGGTGCACGGGGCTGCCCTCATCCCTTTTGGTACAA  
 AATTTTTTGGTTTAGTCACTTTCTGTTTTGCAAGTTAGTTGTGCATTTCT  
 TGGTCTGTTTCTTTGTTGATTTCTCCTTATATAGAAGTTCCCTTACATTT  
 ATTACTTAGGGAAAATAGAGTATTCTGATTCATCTTTTCTATTTAAGAC  
 AAAACATTTAAGTGGTTCAGGATTCATACTTCTACCTTTTCCCTGGAATGC  
 TGCAGAGGTCCTCTAACAAGATAGAATTTGAACTTCCCTTTATGGTTCTT

ES 2 667 859 T3

GCAAGTTTATACTCCCTCGGTTTCAATTTGTTTGTCTGGCCTTGACTCAG  
GGGCGGACCTACATGGTCCATGCCGGGTGCTTGAGCAACCAATGACCCCT  
CAAGTGATGTGGATTTCGATTCCCTGGTAGCAACACTTTTTTTTCGTAAAGG  
AATTGAGCACCCACAACCTTCAAATCCTGGATCCGCGCTGCTTTGACTTG  
5 ACACGAAGTTTAAGAAAAGTAAATGAGTCTGAATCTTGTGGTCTTAAACTA  
AAGATAAGCTAAAACAAAATAAATTGAAACTGAGGGAATATCTATTTATGA  
TGTTTCAAATTTGGGTTAATTAGTTGCTTCACATTAGCAGATATTGAAT  
GATTCACTGTTGAATGCTCTGAATTACCGTAGTTATCAAATTTGTTTTTC  
ATTCCTTCTTTAACCTTTGAAGTAATGTGACTAGCGGAATATAGTTTCTT  
10 TGAAGCAACAACCTATTTTATGATTAGGATGACATTTTGCTCAGTCCTTA  
GCTTGTTTTTTTTCCACAAAATTGTTCTTGAATTTGTTTCATTTGCGCGGA  
TCTTCCTGAAAGGTCATTATTATATTCATATGCTATAAACCCACCATGTA  
ATTGCAGTCTACACGTTCTGCAATGAGAGTGAAGCTTTGTCTGCAATCTC  
TAGCAAATCCGAGGGCTTTCATGTTGCCATTGTGGAGGTAGTAGTTACAT  
15 TTTTACTTGAAACTTTCCATATTCACCTTTATGGTAAGACTATTGATCAA  
CAAAATATATTGATCAACAAAATATGAAGACAGGCCAGAATGTTATTCTA  
ACTGTTGATGAATTTGTCTATCAATTGACACAGGTAAGTGCAGGCGATAA  
TGATGGGGTCTCCAATTTCTTGAAAGTGCCAAAAATCTACCAACTATAA  
GTGAGTGCTATATACGAAAAATAAGTGGCGTATTGCAAGTTGACTTA  
20 GTTTCAGCAGATATGATAGTATTGGCAGAGTTAGAAGTGCTAGAATCTTA  
AGTCTTCCAACCTATCACGTAGACCACTGAACTTGAATATTTTGCTTGTC  
TTCAAATGTTTAAACGCTATAACATATCTAAGGGAGCTTTGTTTACTTCG  
TGCAGTGACATCAAATATTCATTCTCTCAGCACAATGATGAAGTGATTG  
CGGTGAACTCTTGGGGCTCAAATTTTCATTTGATGCTAACTGTTTCTGGT  
25 AATTATGTGTGAAAGATGTTCAATGCTTCGATATTTTGACAGCTTGGTGCA  
GTTGAGTTCCTTCAGAAACCATTATCAGATGACAAACTCAAAAATATATG  
GCAGCATGTAGTTCACAAGGTTTGTAAATCCAAACTTCACACAATCAGCTT  
AGTTCTTTCAAATCAGTATGCTTATTATATGAAAAGGAAATCCTGATCTT  
ATTGGTTGCAACAGGCATTCAATGCTAGAAAGGATGTGTCCGGACCACTT  
30 GAGCCGGTAAAAGAATCTCTTCTTTCGATGCTACAGCTACAACCAGAAAA  
GGGTGAACCAGATGACAAAAGTTCAAATGGAACAGAACCTCTCATTGCAG  
TTGCGGACAACAATACCGAACAGTCATCGGGCTGTGATAAATACCCTGCT  
CCCTCAACCCCTCAATTGAAACAAGGAGTGCGGTGAGTGGATGATAGTGA  
CTGCCATGATCATACTATCTTCTCAACTGACCAAGACAATGGGGAGCATG  
35 ATGGTGACACTAAATCCGTCGAAACTACTTATAACAATTCACCTTGCTGAG  
AATACTGTCCAAATAAGTCCTCCTGGGCAACAAGAAGATATAATTTTGAA  
AGAGGAGAATGGTTCATCTCCTCATCAAACCTATGGAGGCTGATATTGCTA

ES 2 667 859 T3

CCTTTTCACAAATTAATGACTGCGCTGACAATAGTGATGGTTCATCTCCT  
CATCAAAAGACGGAGGCTGATATTGCTACTACCTCTTCACAAAGTAAAGA  
CTGCCCTGACAATAGCATTAGTCATTCTGCTGAACCTAGTAAAGCTTCTG  
GTCCCATAGCTCAAGTGGGACTAAATCCAATAAGAAAAAGGTGAAGGTA  
5 AGATGGAAGAAATGATACTTTGGTTCTCATAGTACAATAATGAAGTAACT  
ACGCACTCAACGGTCCGTAATATTAGTGTCCAAGAATGCCATTATGTTTT  
GTCTACTGGTCCGAAGGTATAAGAATGTTGCATAACTTTTCGCATGCATT  
CTTAAAACATGTTTCATGATTGCTTCTCTTGCTCATCAGTCATACGGTCT  
TTTGTTATTTATCTCTTCTTTCTATAAAAGGGGATGAGATGAAGATATTA  
10 CATGTGGCATTGCGTGTATCTTTCTCCTCTTGCAATTAACGAATTTAGCCT  
TATGAACTGTTAAGTTCTTAGAGAACTTCATGGCTATCATAGAACATCCT  
TTTCAAGTTCCATTTTCGTCTATGATTTATCAATTACAGTGGATCTTTCAA  
GATTCTGCTTAAAGCACCTTTAAGATGAATGCGAGGCTCATTTTGTTATC  
TCGAAGTTTGAACCTCTCAAACGGTGTATGAATCTATAATATGGTAATCA  
15 GTATAGGAATTTAGCTAGAGTTGTGTTGGGGATTTAGCCTTAAATGTAG  
TTGACTGAGCAGCGGTGAAACAATTCTGCATTCTTCGAAGTTTGAATTGC  
GTGTTTCAGGGGGATAAGTTTGGTATTTCTTTGGATTCAGGTAGATTGG  
ACACCTGAACTACACAAAAAGTTTGTTCAAGCAGTAGAGCAACTCGGTAT  
AGATCAAGCCATTCCTTCTCGAATACTAGACGTGATGAAAGTGGAGGGCT  
20 TAACGAGACATAACATAGCTAGCCATCTCCAGGTTTGTGAGTTCTGCTCT  
TTCATATCTTAATGAATATGTTTGCTATGTTTGGCAGCGTCGGAAGCAAT  
TTGGCTGAAAGATGTCTTAATATAAATGTTCTAACATTGGGGAAAACGCG  
ATAGTACTAAATCTTGACCATTTTCAGCCTGTTGGCACCTCAAGTTAGAT  
AAATATTCATTTGATATTTCCATATCCTTGGAGGGGATGTAGTATAGCAG  
25 TTGTGCTACAAAAAGTTGGATGTTGATAATATTTTTCCGTTTAAACAATA  
GTATCACCTTTCAATTTCCAAGCAGAAATACAGAATGCATCGGAGGCAAA  
TTTTGCCAAGGGAAGTGAAAGGAGATGGCCCCATCCGCAACCTAGAGAT  
TCAGTACAAAGGAATTAATCCTCATAAACCTGTCATGACATTCCCACC  
ATATCATTCTAATCATGTCGCCCCAGCTGGTCAATGTTATCCTGCTTGGG  
30 TACCACCGGCTAGTTATCCGAATGGTTTACAAGTGTGGGGTTACACCTTAC  
TATCCGGGATGGCAGCCTGCAGAGACTTGGCACTGGAAGCCTCATCCAGG  
GGTAAACCTTTTTTTCCCTTAGACCACATTGCATGCCTATGTCAACATAT  
TTCACAGGATATTTTAGGTCTAGGAAATACCACACCTAAAACTTATGTT  
TTGTAATAATGCAGCTGCTTGCTGATACATGGGGCTCCCCTGTCATGCCA  
35 CCATCGTTTGGATCGTATCCACCATATCCCCAGGTGAGTTCATTGGCAAT  
ATATCACCCCCGTTAGATATTTTTATGTTCAATATGACAACGTTCTTGAG  
ATATTTTCATGTGAATGCACTCTTGGGTTGAGTTCTTAATGGCACATCGGT

ES 2 667 859 T3

TGGATGATGCAGAATGCTGGAATGTACCAGTCTCACGGAATGCATAACAG  
ATATAGCATGCTAGAGAAGTCATTTCGATGTTACCCGGTAAGATTGTAGA  
TCCTATTTTCAGACCGACAAACTTCTTTATACATAAATGCACTAGGAGATT  
ATTCATATTCCAGTTTTCGTTTTCCCTTTTGGAGCTACAAAGGAAAAACAC  
5 AACGTAATGTTTTATGGCTTATGTTGTATTAAGTGAAGGAAAATGTTTT  
TCAATTTTTTCGATGTTCCACTGGTCAAAAGTTTTGAAAAATATTTTCTCT  
AGAAAAATAAGTTGCTTGAAAAATGAGAAAAATGACATTTCTAGTGGAAG  
TAAGGAAAACAAGTCCACCTGTGGCATTCCACATTGATTGTGTTCTCAT  
TCCTCCAATACTCCAACACACTTCATCTTCACCCCTACCCTCGTAGCTC  
10 CATGCCACCGTCCATAATATTCTCTAGATTATATACAAATACTTTAAGG  
ACAATGTTTTTTTGTTCAGTGCCGAACACTAGAAAATAAGTAAGAACCG  
AACATAAGAAAGTACGTTTCTAAGTAAGAACTCACTCATTTTCCTAGAA  
AATATTTTCCACGAAAACATTGTTTCGTGAAAACATTTTCCTTCATACCA  
AACACACCCTTAGCCCTAGAATTCATTCGATAATCGTGCCAAAACACTACAT  
15 ATGTGTAATGAAGGGGAGGCACTGGGTAAACTTGACCAATCATCTCCAA  
AATGGATCTAAATTACATACAATACAACTACACTGCTAACGTAICTCAGTG  
CAATCTCATGAGTGGCTAAATTACATACAATCACCGGGTAAAAAGAGAAT  
ATATTATTTGACTAGTATGTATAATTAGTTGTCACATTGGTTTAAGAAGG  
GGTTATAGTGCTTGGACAACCCTTACCATGCTAGCTTTTTGAGGTTTGAT  
20 TAGGCCTAAGGTCCATTTTATCATAACTAGATTATCGACCCCAACCCCC  
CGGTACACTATAGCTAGTATTGGTCTCCTAGTAACTTGATAGTATAAAAT  
TTTTTATTGGTTAAGTTTTGGTTGGTGGTGTGTGCAG

A partir de esto, puede predecirse una secuencia de ADNc de APRR2 de pimiento (SEQ ID NO: 2):  
>1553CDS

25 atgatttgattgaggatgaattattgggtggaaagattcccaaaggggctaaagtctctccttg  
atgaagatagcagctctgctgctgagatgaaatcaaggcttgagaaaatggactatatagtctacacgtt  
ctgcaatgagagtaagcttctgctgcaatctctagcaaatccgagggcttcatgttgccattgtggag  
gtaagtgcaggcgataatgatggggctcctcaattctgaaagtccaaaaatctaccaactataatga  
catcaaatattcattctctcagcacaatgatgaagtgtattgcgcttggtgcagttgagttccttcagaa  
30 accattatcagatgacaaactcaaaaatatatggcagcatgtagttcacaaggcattcaatgctagaag  
gatgtgctcggaccacttgagccggtgaaagaatctctctctctgatgctacagctacaaccagaaaagg  
gtgaaccagatgacaaaagttcaaatggaacagAACCTCTCATTGCAGTTGCGGACAACAATACCGAACA  
gtcatcgggctgtgataaatccctgctccctcaaccctcaattgaaacaaggagtgcggtcagtggtgat  
gatagtactgcatgatcatactatctctcaactgaccaagacaatggggagcatgatggtgacacta  
35 aatccgtcgaactactataacaattcactgctgagaactgctcaataaagtctcctctgggcaaca  
agaagatataatggaaagaggagaatggtcatctcctcatcaactatggaggctgatattactacc  
tctcacaagtaaagactgccctgacaatagcattagtctctgctgaacctagtaaagcttctggtc

ES 2 667 859 T3

cccatagctcaagtgaggactaaatccaataagaaaaagggtgaaggtagattggacacctgaactacacaa  
aaagttgtcaagcagtagagcaactcggtagatcaagccattccttctgaatactagacgtgatg  
aaagtgagggttaacgagacataacatagctagccatctccagaatacagaatgcatcggaggcaaa  
tttgccaaggaagtgaaaggagatggcccatccgcaacctagagattcagtacaaaggaattacta  
5 tctcataaacctgcatgacattcccaccatatcattctaatacatgtcgccccagctggtcaatgttat  
cctgctgggtaccaccggctagtattccgaatggtttacaagtgtggggtcaccttactatccgggat  
ggcagcctgcagagactggcactggaagcctcatccagggtgcttctgatacatggggctcccctgt  
catgccaccatcgttggatcgtatccaccatatcccagaatgctggaatgtaccagtctcacggaatg  
cataacagatatagcatgctagagaagtcattcgatgttcacccg

10 La secuencia de ADNc de APRR2 de pimiento truncada comprende la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 15):  
>16113CDS

atgatttgattgaggatgaattattgggttgaaagattcccaaaggggttaaaagcctcctccttg  
atgaagatagcagctctgctgctgagatgaaatcaaggcttgagaaaatggactatatagtctacacgtt  
ctgcaatgagagtgaagcttctgcaatctctagcaaatccgagggttcatgttgcattgtggag  
15 gtaagtgcaggcgataatgatggggtcctcaatttctgaaagtgcacaaaatctaccaactataatga  
catcaaatattcattctcagcacaatgatgaagtgtattgcgcttgggtgcagttgagttccttcagaa  
accattatcagatgacaaaactaaaaatataatggcagcatgtagttcacaaggcattcaatgctagaag  
gatgtgtccggaccacttgagccgtaaaagaatctcttcttctgatgctacagctacaaccagaaaagg  
gtgaaccagatgacaaaagttcaatggaacagaacctctcattgcagttgaggacaacaataccgaaca  
20 gtcacgggctgtgataaatccctgctccctcaaccctcaattgaaacaaggagtgcggtcagtgatg  
gatagtgactgcatgatactatcttctcaactgaccaagacaatggggagcatgatggtgacacta  
aatccgtcgaactactataacaattcactgctgagaatactgtccaataagtctcctgggcaaca  
agaagatataatgtgaaaggaggagaatggtcattctcctcatcaaatatggaggctgatattactacc  
tctcacaagtaaagactgccctgacaatagcattagtctctgctgaacctagtaaagcttctggtc

25 cccatagctcaagtgaggactaaatccaataagaaaaagggtgaaggtagattggacacctgaactacacaa  
aaagttgtcaagcagtagagcaactcggtagatcaagccattccttctgaatactagacgtgatg  
aaagtgagggttaacgagacataacatagctagccatctccagaatacagaatgcatcggaggcaaa  
tttgccaaggaagtgaaaggagatggcccatccgcaacctagagattcagtacaaaggaattacta  
tctcataaacctgcatgacattcccaccatatcattctaatacatgtcgccccagctggtcaatgttat  
30 cctgctgggtaccaccggctagtattccgaatggtttacaagtgtggggtcaccttactatccgggat  
ggcagcctgcagagactgacactggaagcctcatccagggtgcttctgatacatggggctcccctgt  
catgccaccatcgttggatcgtatccaccatatcccagaatgctggaatgtaccagtctcacggaatg  
cataacagatatagcatgctagagaagtcattcgatgttcacccg

La secuencia genómica de APRR2 de pimiento truncada es la siguiente (SEQ ID NO: 16):

35 >16113  
TTTCCCCTAAAAAAGATCTATTACATGGGGTTTTTCTGTTTTATGTTGG  
TTCTTATTTAAAGCTGAAAATAGTCTTTGTCTCTTTCTTTTTGTTAGA



TGATGTTGAAGATTCAAGCTTGAAAAAGTGTGTCAGAAGGAGTGGGGGGG  
 GGGGGGTTGATTTTTTTTGTATTTTTGAGACATGTAATAATTATGAG  
 TGATATTTACTGTAAGGTTTAAGAGGGATTTTGCTAAAGGTTGAATTTTT  
 AATGTAAATCTGAGGGGAATTCCTTTTTGGATGTGCAGATTCAATTGGTA  
 5 ATGACTGATTAAGTACTGTTTTTTGGAGGCACTAATTTGGCTGACCTAAA  
 AAGGATGCCTTTTTAGAAATGATTTGCATTGAGGATGAATTATTGGGTTG  
 GAAAGATTTCCCAAAGGGGCTTAAAGTCCTCCTCCTTGATGAAGATAGCA  
 GCTCTGCTGCTGAGATGAAATCAAGGCTTGAGAAAATGGACTATATAGGT  
 AAGTAGTTGTAACCCAGTCTAAAAATACTTACTCGCACCCGGTGTATG  
 10 TTTTTTTTTTTCTTTTGGTTTTGCTCATTCTTTTGGTGTTCCTGTAA  
 AGTTGCTGCAATATGACTAGGAGGTCAGAAACAGCCTCTTGCTGAAATGC  
 AAGGTAAGGCTGCGTACAATAAACTCATGTAGTTGACACTTTCCTATGC  
 ATATCGGGAGTTTTGGTGCACGGGGCTGCCCTCATCCCTTTTGGTACAAA  
 ATTTTTGGTTTAGTCACTTTCTGTTTTGCAAGTTAGTTGTGCATTTCTT  
 15 GGTCTGTTCTTTGTTGATTTCTCCTTATATAGAAGTTCTTTACATTTA  
 TTAAGTTAGGGAAAATAGAGTATTCTGATTCATCTTTTCTATTTTAAGACA  
 AAACATTTAAGTGGTTCAGGATTCATACTTCTACCTTTTCTGGAATGCT  
 GCAGAGGTCCTCTAACAAGATAGAATTTGAACTTCCCTTTATGGTTCTTG  
 CAAGTTTATACTCCCTCGGTTTCAATTTGTTTGTCTGGCCTTGACTCAGG  
 20 GGCGGACCTACATGGTCCATGCCGGGTGCTTGAGCAACCAATGACCCCTC  
 AAGTGATGTGGATTGATTCCTGGTAGCAACACTTTTTTTTGTAAAGGA  
 ATTGAGCACCCACAACCTTCAAATCCTGGATCCGCGCTGCTTTGACTTGA  
 CACGAAGTTTAAGAAAAGTAAATGAGTCTGAATCTTGTGGTCTTAAACTAA  
 AGATAAGCTAAAACAAATAAATGAACTGAGGGAATATCTATTTATGAT  
 25 GTTTCAAAATTTGGGTTAATTAGTTGCTTACATTAGCAGATATTGAATG  
 ATTAAGTTGTTGAATGCTCTGAATTACCGTAGTTATCAAATTTGTTTTTCA  
 TTCTTTCTTTAACCTTTGAAGTAATGTGACTAGCGGAATATAGTTTCTTT  
 GAAGCAACAACCTATTTTATGATTAGGATGACATTTTGCTCAGTCCTTAG  
 CTTGTTTTTTTTCCACAAAATTGTTCTTGAATTTGTTTCATTTGCGGGAT  
 30 CTTCTGAAAGGTCATTATTATATTCATATGCTATAAACCCACCATGTAA  
 TTGCAGTCTACACGTTCTGCAATGAGAGTGAAGCTTTGTCTGCAATCTCT  
 AGCAAATCCGAGGGCTTTTATGTTGCCATTGTGGAGGTAGTAGTTACATT  
 TTTACTTGAACTTTCCATATTCACCTTTATGGTAAGACTATTGATCAAC  
 AAAATATATTGATCAACAAAATATGAAGACAGGCCAGAATGTTATTCTAA  
 35 CTGTTGATGAATTTGTCTATCAATTGACACAGGTAAGTGCAGGCGATAAT  
 GATGGGGTCCCAATTTCTTGAAGTGCCAAAAATCTACCAACTATAAG  
 TGAGTGCTATATATACGAAAAATAAGTGGCGTATTGCAAGTTGACTTAG

ES 2 667 859 T3

TTTCAGCAGATATGATAGTATTGGCAGAGTTAGAAGTGCTAGAATCTTAA  
GTCTTCCAACATATCACGTAGACCACTGAACTTGGAAATATTTTGCTTGTCT  
TCAAATGTTTAAACGCTATAACATATCTAAGGGAGCTTTGTTTACTTCGT  
GCAGTGACATCAAATATTCACTCTCTCAGCACAATGATGAAGTGTATTGC  
5 GGTGAACTCTTGGGGCTCAAATTTTCATTTGATGCTAACTGTTTCTGGTA  
ATTATGTGTGAAAGATGTTCAATGCTTTGATATTTTGCAGCTTGGTGCAG  
TTGAGTTCCTTCAGAAACCATTATCAGATGACAACTCAAAAATATATGG  
CAGCATGTAGTTCACAAGGTTTGTAACTCAAACCTTCACACAATCAGCTTA  
GTTCTTTCAAATCAGTATGCTTATTATATGAAAAGGAAATCCTGATCTTA  
10 TTGGTTGCAACAGGCATTCAATGCTAGAAAAGGATGTGTCCGGACCACTTG  
AGCCGGTAAAAGAATCTCTTCTTTTCGATGCTACAGCTACAACCCAGAAAAG  
GGTGAACCAGATGACAAAAGTTCAAATGGAACAGAACCTCTCATTGCAGT  
TGCGGACAACAATACCGAACAGTCATCGGGCTGTGATAAATACCCTGCTC  
CCTCAACCCCTCAATTGAAACAAGGAGTGCGGTCAGTGGATGATAGTGAC  
15 TGCCATGATCATACTATCTTCTCAAACGACCAAGACAATGGGGAGCATGA  
TGGTGACACTAAATCCGTGCAAACTACTTATAACAATTCATTGCTGAGA  
ATACTGTCCAAATAAGTCCCTGCGCAACAAGAAGATATAATTTTGAAA  
GAGGAGAATGGTTCATCTCCTCATCAAACCTATGGAGGCTGATATTGCTAC  
CTTTTACAAATTAATGACTGCGCTGACAATAGTGATGGTTCATCTCCTC  
20 ATCAAAGACGGAGGCTGATATTGCTACTACCTCTTCACAAAGTAAAGAC  
TGCCCTGACAATAGCATTAGTCATTCTGCTGAACCTAGTAAAGCTTCTGG  
TCCCCATAGCTCAAGTGGGACTAAATCCAATAAGAAAAAGGTGAAGGTAA  
GATGGAAGAAATGATACTTTGGTTCTCATAGAACAATAATGAAGTAACTA  
CGCACTCAACGTTCTGTAATATTATTGTCCAAGAATGCCATTATGTTTTG  
25 TCTACTGGTTCGAAGGTATAAGAATGTTGCATAACTTTTCGCATGCATTC  
TTAAACATGTTTCATGATTGCTTCTCTTGCTCATCAGTCATACGGTCTT  
TTGTTATTTATCTCTTCTTTCTATAAAAAGGGGATGAGATGAAGATATTAC  
ATGTGGCATTGCGTGTATCTTTCTCCTCTTGCATTAACGAATTTAGCCTT  
ATGAACTGTTAAGTTCTTAGAGAACTTCATGGCTATCATAGAACATCCTT  
30 TTCAAGTTCATTTTCGTCTATGATTTATCAATTACAGTGGATCTTTCAAG  
ATTCTGCTTAAAGCACCTTAAAGATGAATGCGAGGCTCATTTTGTATCT  
CGAAGTTTGAACCTCTCAAACGGTGTATGAATCTATAATATGGTAATCAG  
TATAGGAATTTAGCTAGAGTTGTGTTGGGGATTTTCAGCCTTAAATGTAGT  
TGACTGAGCAGCGGTGAAACAATTCTGCATTCTTCGAAGTTTGAATTGCG  
35 TGTTTCAGGGGGATAAGTTTGGTATTTCTTTGGATTTCAGGTAGATTGGA  
CACCTGAACTACACAAAAAGTTTGTTCAGCAGTAGAGCAACTCGGTATA  
GATCAAGCCATTCCTTCTCGAATACTAGACGTGATGAAAGTGGAGGGCTT

ES 2 667 859 T3

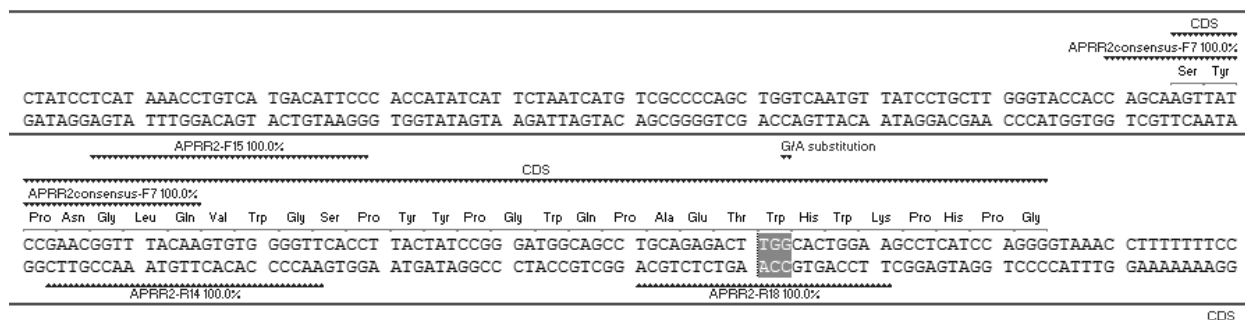
AACGAGACATAACATAGCTAGCCATCTCCAGGTTTGTGAGTTCTGCTCTT  
TCATATCTTAATGAATATGTTTGTCTATGTTTGGCAGCGTCGGAAGCAATT  
TGGCTGAAAGATGTCTTAATATAAATGTTCTAACATTGGGGAAAACGCGA  
TAGTACTAAATCTTGACCATTTTCAGCCTGTTGGCACCTCAAGTTAGATA  
5 AATATTCATTTGATATTTCCATATCCTTGGAGGGGATGTAGTATAGCAGT  
TGTGCTACAAAAAGTTGGATGTTGATAATATTTTTCCGTTTAAACAATAG  
TATCACCTTTCAATTTCCAAGCAGAAATACAGAATGCATCGGAGGCAAAT  
TTTGCCAAGGGAAGTGGAAGGAGATGGCCCCATCCGCAACCTAGAGATT  
CAGTACAAAGGAATTACTATCCTCATAAACCTGTCATGACATTCCCACCA  
10 TATCATTCTAATCATGTGCGCCCAGCTGGTCAATGTTATCCTGCTTGGGT  
ACCACCGGCTAGTTATCCGAATGGTTTACAAGTGTGGGGTTCACCTTACT  
ATCCGGGATGGCAGCCTGCAGAGACTTGACACTGGAAGCCTCATCCAGGG  
GTAAACCTTTTTTCCCTTAGACCACATTGCATGCCTATGTCAACATATT  
TCACAGGATATTTTAGGTCTAGGAAATACCACACCTAAAACTTATGTTT  
15 TGTAATAATGCAGCTGCTTGCTGATACATGGGGCTCCCCTGTCATGCCAC  
CATCGTTTGGATCGTATCCACCATATCCCCAGGTGAGTTCATTGGCAATA  
TATCACCCCGTTAGATATTTTTATGTTTCAAGTATGACAACGTTCTTGAGA  
TATTTTATGTGAATGCACTCTTGGGTGAGTTCTTAATGGCACATCGGTT  
GGATGATGCAGAATGCTGGAATGTACCAGTCTCACGGAATGCATAACAGA  
20 TATAGCATGCTAGAGAAGTCATTCGATGTTTACCCCGTAAGATTGTAGAT  
CCTATTTTCCAGACCGACAACTTCTTTATACATAAATGCACTAGGAGATTA  
TTCATATTTCCAGTTTTCGTTTTCCCTTTTGGAGCTACAAAGGAAAAACACA  
ACGTAAATGTTTTATGGCTTATGTTGTATTAAGTGAAGGAAAATGTTTTT  
CAATTTTTTCGATGTTCCACTGGTCAAAGTTTTGAAAAATATTTTCTCTA  
25 GAAAAATAAGTTGCTTGAAAAATGAGAAAAATGACATTTCTAGTGGAAGT  
AAGGAAAAACAAGTTCACCTGTGGCATTCCACATTGATTGTGTTCTCATT  
CCTCCCAATACTCCAACACACTTCATCTTACCCCTACCCTCGTAGCTCC  
ATGCCACCGTCCATAATATTCTCTAGATTATATACAAATACTTTAAGGA  
CAATGTTTTTTTTGTTTACGTGCCGAACACTAGAAAATAAGTAAGAACCGA  
30 ACATAAGAAAGTACGTTTCTAAGTAAGAAACTCACTCATTTTCTAGAAA  
ATATTTTCCACGAAAACATTGTTTCGTGGAAAACATTTTCTTCATACCAA  
ACACACCCTTAGCCCTAGAATTCATTTCGATAATCGTGCCAAAACTACATA  
TGTGTAATGAAGGGGAGGCACTGGGTTAACTTGACCAATCATCTCCAAA  
ATGGATCTAAATTACATACAATACAACAACACTACTAACGTAICTCAGTGC  
35 AATCTCATGAGTGGCTAAATTACATACAATCACCGGGTAAAAAGAGAATA  
TATTATTTGACTAGTATGTATAATTAGTTGTCACATTGGTTTAAAGAAGGG  
GTTATAGTGTCTTGGACAACCCTTACCATGCTAGCTTTTGGAGTTTGATT

AGGCCTAAGGTCCATTTTATCATAACTAGATTATCGACCCCCACCCCCC  
 GGTACACTATAGCTAGTATTGGTCTCCTAGTAACTTGATAGTATAAAATT  
 TTTTATTGGTTAAGTTTTGGTTG

5 Se diseñaron cebadores para secuenciar el BAC. La secuencia de BAC se ensambló usando el programa de ensamblaje Sequencher 4.9 de Genecodes Inc. Para determinar las regiones codificantes del gen, las secuencias EST de tomate y pimienta se sometieron a análisis BLAST frente a la secuencia genómica de pimienta usando el algoritmo BLAST2. Se generó un mapa de la secuencia genómica usando Vector NTI de Invitrogen.

10 Para recuperar la secuencia de las líneas de pimienta 16113 y 1553A, se extrajo el ADN de tejido foliar joven usando el método CTAB (Doyle y Doyle, 1990). Entonces se usó un subconjunto de los cebadores anteriores para amplificar regiones de ambas líneas de pimienta. Los productos de amplificación se secuenciaron por el método de Sanger en el ABI3730XL, y se alinearon usando Sequencher.

15 La secuenciación del gen de tipo APRR2 de pimienta de progenitores con frutos rojos y blancos de la población cartografiada reveló evidencias de un polimorfismo entre estos 2 genotipos. Al alinear la secuencia de ADNc disponible con la secuencia genómica fue posible identificar una sustitución G-A que produce un codón de parada en el progenitor blanco:



20 La secuencia del pimienta de tipo silvestre y mutante de truncamiento se muestra en la SEQ ID NO: 14 y 16, respectivamente. Por lo tanto, se concluye que el gen está truncado en el progenitor blanco. Un análisis de secuencia adicional del gen APRR2 en todos los individuos en la población de color maduro revela que todos los genotipos que tienen frutos inmaduros blancos contienen el codón de parada. La distribución de los genes truncados en otros tipos es menos clara. No se encontraron frutos inmaduros blancos que no tuvieran el truncamiento, de modo que se cree que es necesario para el fenotipo blanco. El fenotipo de color blanco causado por la sustitución G-A se hereda de forma recesiva.

**Ejemplo 12**

**25 Frecuencia de la presencia de alelos rojos y blancos en pimienta**

El análisis de la presencia del alelo del tipo APRR2 del progenitor blanco y rojo en toda la población de cartografiado de color maduro revela una correlación entre el alelo rojo o blanco y verde claro, o el color de fruto inmaduro blanco dentro de la población (véase la figura 9). La presencia del alelo PSY1 rojo o blanco se incluye para las comparaciones. Este gen no se correlaciona con los tipos de color inmaduro. Puede observarse que el alelo rojo está presente a alta frecuencia en frutos inmaduros de color verde claro. El alelo blanco está presente a alta frecuencia en frutos inmaduros blancos.

**Ejemplo 13**

**Análisis de qRT-PCR de genes de pimienta**

35 El ensayo a tiempo real basado en TaqMan se diseñó para su uso sobre máquinas de detección de secuencia ABI 7900HT usando el programa informático Primer Express. Se realizó una búsqueda BLAST del amplicón frente a las bases de datos de pimienta DFCI pública y de Syngenta patentada. Se encontró únicamente un acierto con una coincidencia de un 100% de la secuencia completa del amplicón. El ensayo se validó usando diluciones en serie de ARN extraído de tejido foliar y frutal combinado. La eficacia de reacción (1,01) y la fluorescencia máxima (3,5) pasaron ambas los parámetros de validación GM ADT. Las reacciones se combinaron en un volumen de 10 ul usando reactivos de RT-PCR de una etapa y ajustes del termociclador típicos.

**Ejemplo 14**

**Análisis de expresión en toda la población de color maduro de pimienta**

El análisis de qRT-PCR de la expresión del gen de tipo APRR2 en la población de color maduro reveló evidencias de un aumento en la expresión asociada con la secuencia génica completa (APRR2+) en comparación con el gen truncado (APRR2-) - véase la figura 10. La figura muestra la media de varios puntos de datos con un alto coeficiente de varianza. Estos datos apoyan los datos de secuencia de ARNm donde la expresión de APRR2 es máxima en el estado inmaduro.

### Referencias

- Batu, A. y Thompson, A.K. 1998, Tr. J. Agr. & Forestry, 22, 365-372.
- Doyle JJ y Doyle JL (1990) Focus 12: 13-15.
- Ebert *et al.*, 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:5745-5749.
- 10 Eckstein F (ed) (1991) Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach. Oxford Univ. Press, NY 1991.
- Eriksson EM, Bovy A, Manning K, Harrison L, Andrews J, De Silva J, Tucker GA, Seymour GB, 2004 Plant Physiol.; 136(4):4184-97.
- Exama, A., Arul, J., Lencki, R.W., Lee, L.Z. y Toupin, C. 1993. J. Food Sci. 58: 1365-1370.
- Forth D. y Pyke K.A. Journal of Experimental Botany, Vol. 57, n.º 9, pág. 1971-1979, 2006.
- 15 Fray A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD 2000. Science; 289(5476):85-8.
- Fray y Grierson, 1993 Plant Mol Biol.;22(4):589-602.
- Fridman E, Carrari F, Liu YS, Fernie AR, Zamir D. 2004 Science;305(5691):1786-9.
- Gautier, L., *et al.* 2004 Bioinformatics 20307-315.
- 20 Geeson, J.D., Browne, K.M., Maddison, K.I., Shepherd, J. y Guaraldi, F. 1985. J. Food Technol. 20:339-349.
- Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).
- Heidmann I, de Lange B, Lambalk J, Angenent G, Boutilier K (2011). Plant Cell Rep. Jun; 30 (6):1107-15.
- Huh J.H., B. C. Kang, S. H. Nahm, S. Kim, K. S. Ha, M. H. Lee y B. D. Kim TAG Theoretical and Applied Genetics 102, n.º 4, 524-530.
- 25 Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. (2003) Biostatistics. Abr; 4(2):249-64.
- Knapp S (2005) New nomenclature for Lycopersicon [http://sgn.cornell.edu/about/solanum\\_nomenclature.pl](http://sgn.cornell.edu/about/solanum_nomenclature.pl)
- Lawton *et al.*, 1987 Plant Mol Biol. 9:315-324.
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB.
- 30 2006. Nat Genet.;38(8):948-52.
- Nakagawa T, Suzuki T, Murata S *at al.*, 2007 Biochemistry, 71(8)2095-2010.
- Nielsen *et al.* (1991. Science 254:1497-1500).
- Odell *et al.*, 1985 Nature 313:810-812.
- Pearson WR (1990) Methods in Enzymology 183: 63-98.
- 35 Pyke A y Leech R (1991) Plant Physiology, 96, 1193-1195.
- Sambrook J, y Russell DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Nueva York, NY, EE. UU., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shimamoto K. *et al.*, 1989. Nature 338:274-276.
- 40 Smyth, G. K. (2005). Limma: Linear Models for microarray data. En: Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor, R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds.), Springer, Nueva York, pág. 397-420.

Smith T, Waterman M (1981) J. Mol. Biol: 147, 195-197.

Thompson, A.J., Tor, M., Barry, C.S., Vrebalov, J., Orfila, C., Jarvis, M.C., Giovannoni, J.J., Grierson, D. y Seymour, G.B. (1999). Plant Physiology 120:383-389.

5 Thompson AJ, Tor M, Barry CS, Vrebalov J, Orfila C, Jarvis MC, Giovannoni JJ, Grierson D, Seymour GB. Science. 2002; 296(5566):343-6.

Tijssen P (1993) Hybridization With Nucleic Acid Probes. Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation. En: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier.

Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J (2002) Science 296: 5566, 343 - 346.

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para producir una planta transgénica con velocidad aumentada de maduración de los frutos en comparación con frutos de una planta no transformada en el estado verde maduro, que comprende regenerar una planta a partir de una célula hospedadora que expresa un vector que comprende una secuencia de nucleótidos aislada seleccionada del grupo que consiste en:
- a) una secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1;
- b) una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80% idéntica a la secuencia de nucleótidos de a);
- 10 c) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de cualquiera de las secuencias de nucleótidos a) a b); y
- d) una secuencia de nucleótidos que es el complemento de las secuencias de nucleótidos de una cualquiera de a) a c).
- en el que la planta es de tomate, preferiblemente *Solanum lycopersicum* o de pimiento, preferiblemente *Capsicum annuum*.
- 15 2. Un método de manipulación de la velocidad de maduración en frutos de una planta solanácea transgénica, que comprende transformar dicha planta con el vector de la reivindicación 1.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la velocidad de maduración de los frutos está aumentada en comparación con frutos de una planta no transformada en el estado verde maduro.
- 20 4. Una planta cultivada o parte de la misma producida por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Un método de detección de marcadores genéticos indicativos de la velocidad de maduración de los frutos de una planta de la familia de las solanáceas, que comprende:
- a. aislar ADN de dicha planta y de uno o ambos progenitores de dicha planta;
- b. cribar los marcadores genéticos en una región de dicha secuencia de ADN correspondiente a la SEQ ID NO: 1; y
- 25 c. determinar la herencia conjunta de dichos marcadores de uno o ambos progenitores a dicha planta.
6. Un marcador genético detectable por el método de la reivindicación 5.
7. Uso de un marcador genético de la reivindicación 6 para la selección de una planta solanácea cultivada, preferiblemente una planta de pimiento o tomate, que puede albergar frutos.
- 30 8. Uso de las secuencias de nucleótidos aisladas SEQ ID NO: 1 en la manipulación de la velocidad de maduración de los frutos de una planta solanácea, preferiblemente una planta de tomate o una planta de pimiento, en el que dicha manipulación se logra por modificación genética de dicha planta y en el que dicha modificación genética se introduce por TILLING.