

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 369**

51 Int. Cl.:

A01H 1/02 (2006.01)

A01H 1/04 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2009 PCT/IB2009/054348**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010 WO10041190**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2009 E 09787362 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2343966**

54 Título: **Mutaciones inducidas relacionadas con heterosis**

30 Prioridad:

06.10.2008 US 103048 P
27.01.2009 US 202073 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2019

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
LTD. (100.0%)
Hi Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat
Ram, P.O. Box 39135
91390 Jerusalem, IL**

72 Inventor/es:

**ZAMIR, DANI;
LIPPMAN, ZACHARY B. y
KRIEGER, URI**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 714 369 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

Mutaciones inducidas relacionadas con heterosis

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere al campo de cultivo de plantas, en particular a plantas de tomate híbridas.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 [0002] La heterosis, o vigor de planta híbrida, es un fenómeno en el que las plantas híbridas muestran fenotipos superiores en comparación con cualquiera de sus líneas parentales consanguíneas. El vigor híbrido se descubrió en la cría de maíz hace casi un siglo, y posteriormente se ha encontrado que ocurre en muchas especies de cultivos (Duvick DN 2001. Nat Rev Gent 2, 69-74). Una gran parte del dramático aumento de la producción agrícola durante la última mitad del siglo XX se ha atribuido al desarrollo y uso de variedades de semillas híbridas en cultivos básicos, como, por ejemplo, maíz, trigo, sorgo, girasol, alfalfa y canola.

15 [0003] Para el maíz, se estima que heterosis aumenta los rendimientos de cultivos en al menos un 15%, lo que, en combinación con las líneas endogámicas de mayor rendimiento modernas y mejora de las técnicas agronómicas, se ha traducido en un aumento lineal constante en el rendimiento. A fines del siglo pasado, se estimó que el 65% de la producción mundial de maíz se basaba en híbridos, con otros cultivos, como el sorgo y el girasol, que mostraron cifras similares. En conjunto, el aumento de las ventajas de rendimiento debido a los híbridos oscila entre el 15 y el 50%, según el cultivo (Duvick DN 1999. En: The genetics and exploitation of heterosis in crops, J G Coors and S Pandey, eds. Madison: American Society of Agronomy, Inc. and Crop Science Society of America Inc. pp. 19-29).

20 [0004] Con tales grandes beneficios de rendimiento, no es de extrañar que la cría de los alimentos y cultivos de biocombustibles futuros se basa en el desarrollo de plantas híbridas; sin embargo, los principios que gobiernan la heterosis todavía no se comprenden. Los esfuerzos para descifrar las bases genéticas y moleculares de la heterosis para que su poder pueda ser aprovechado y utilizado de manera más eficiente hasta ahora han resultado infructuosos. A lo largo de los años, las plantas de cultivo han proporcionado los recursos genéticos para estudiar la heterosis debido a que las líneas puras parentales se han seleccionado artificialmente para una capacidad de combinación híbrida máxima, y la creación de poblaciones genéticas estructuradas permite un fenotipado cuantitativo robusto. De hecho, gran parte del conocimiento sobre la heterosis proviene de los estudios genéticos clásicos en el maíz, durante los cuales se definieron las hipótesis fundamentales para la heterosis, que involucran la complementación de la dominación del genoma completo, así como los efectos sobredominantes de gen único (ODO).

25 [0005] Los intentos para refinar la heterosis en componentes genéticos comenzaron hace una década con el desarrollo de marcadores moleculares. El posterior mapeo de loci de rasgos cuantitativos (QTL) en arroz y maíz abordó los modelos clásicos al descomponer la heterosis en factores "mendelianos" y evaluar sus modos de herencia (Stuber CW et al., 1992. Genetics 132, 823-839; Xiao J et al., 1995. Genetic 140, 745-754; Luo et al., 2001. Genetics 158, 1755-1771; Hua J et al., 2003. PNAS 100, 2574-2579). La evidencia sugirió que tanto la dominancia como la sobredominancia (ODO) tienen un papel en la heterosis, con cierta participación de la epistasis, aunque no estaba clara la contribución relativa de cada uno de estos mecanismos.

30 [0006] Ha habido poco progreso hacia la identificación de genes que resulta en loci heterótico, en gran parte debido a la complejidad de las interacciones fenotípicas que definen heterosis y los esfuerzos necesarios para la clonación QTL. A pesar de la disponibilidad de infraestructura genómica para una amplia gama de modelos de plantas y poblaciones genéticas adecuadas, como las poblaciones de línea de introgresión (IL), el QTL de mapeo y clonación con efectos heteróticos sigue siendo extremadamente difícil, y los genes únicos que causan la heterosis para el rendimiento de los cultivos todavía no han sido identificados. Esto se debe principalmente a que la mayoría de los estudios de QTL convencionales comienzan con el objetivo de mapear múltiples loci para un fenotipo definido, y aquellos QTL que ya han sido clonados generalmente involucran loci con efectos significativamente grandes y altas heredabilidades. La heterosis, en contraste, tiene poca similitud con la QTL previamente clonada, ya que su manifestación se basa en interacciones complejas entre los componentes fenotípicos a lo largo del desarrollo, cada uno con su propio modo de herencia, y una influencia dinámica del entorno (Lippman ZB y Zamir D, TIG, 2007, 23, 60-6). Esto generalmente se conoce como heterosis "multiplicativa" o "geométrica". Por lo tanto, se puede suponer que mapear QTL heterótico es equivalente a mapear múltiples rasgos, tal vez genéticamente no relacionados simultáneamente. Esta integración de rasgos hace que la heredabilidad de la heterosis sea relativamente baja en comparación con los fenotipos más discretos, como el peso de la fruta o el contenido de azúcar (Frery A et al., 2000. Science 289, 85-88; Fridman et al., 2004. Science 305, 1786-1789). Esta complejidad es altamente relevante para el fenotipo clásico de heterosis del rendimiento total.

35 [0007] La clonación de genes heteróticos puede requerir recursos genómicos y casi isogénicos adicionales. Además, aunque hay ejemplos de regiones cromosómicas que pueden llevar genes asociados con el rendimiento heterótico debido a pseudo-ODO (Eshed Y y Zamir D 1995. Genetics 141, 1147-1162; Graham GI et al., 1997. Crop

Science 37, 1601 - 1610), no se conocen genes verdaderos de ODO basados en los efectos de un solo gen. Los datos recientes de las IL de tomate proporcionan apoyo indirecto para la ODO verdadera (Semel Y et al., 2006. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 103, 12981-12986). Usando un enfoque fenomático como se describió anteriormente, se encontró que la ODO-QTL se asociaba preferentemente con rasgos para una mejor aptitud reproductiva, como el rendimiento, mientras que los QTL dominantes, recesivos y aditivos estaban dispersos en todas las categorías fenotípicas, incluidos los rasgos no reproductivos. Esta asociación selectiva sugiere que es improbable que la pseudo-ODO explique la heterosis de la IL, como el QTL sobredominante esperado para los rasgos no reproductivos, asumiendo una distribución aleatoria de QTL crecientes dominantes y decrecientes recesivos en todo el genoma, fue mayor en comparación con lo que realmente se encontró. Un estudio de heterosis en *Arabidopsis* llegó a una conclusión similar sobre la base de menos fenotipos (Mitchell-Olds T., 1995. Genetics 140, 1105-1109).

[0008] Al ser heterosis un fenómeno de todo el genoma, se ha especulado que sus mecanismos moleculares implican cambios globales en la expresión génica y proteica. Recientemente, se llevó a cabo un análisis exhaustivo de la expresión de genes en consanguíneos e híbridos de líneas de maíz B73 y Mol7 utilizando micromatrices. Con cerca de 14,000 genes analizados a partir de tejido de plántulas, se llegó a la conclusión de que los patrones de expresión genética sobredominantes podrían contribuir a la heterosis, actuando junto con todos los otros mecanismos de expresión génica, incluida la aditividad y la dominancia. Curiosamente, un estudio de micromatrices casi idéntico en maíz utilizando las mismas líneas puras parentales e híbridos llegó a una conclusión diferente donde la expresión génica es principalmente aditiva en híbridos heteróticos, casi sin ejemplos de ODO. Las diferentes conclusiones pueden ser el resultado de problemas técnicos inherentes asociados con los micromatrices, incluida la fuente de las plataformas de micromatrices, los diferentes umbrales estadísticos y similares.

[0009] El mapeo de la expresión-QTL (eQTL) y el análisis de la asociación entre eQTL y QTL fenotípico también se ha sugerido como una herramienta para dilucidar las bases moleculares de la heterosis. Sin embargo, adoptar este enfoque puede llevar a resultados oscuros basados en la suposición de que la sobredominancia de la expresión génica explica el crecimiento y la sobredominancia morfológica cuando, de hecho, la sobredominancia de la expresión es simplemente uno de los muchos fenotipos moleculares. Es más prudente suponer que el mecanismo molecular que subyace en la expresión de la sobredominancia es independiente del de la sobredominancia morfológica. Una ilustración de este concepto proviene de genes mal expresados en híbridos interespecíficos de *Drosophila*, que son el resultado de la evolución compensatoria cis-trans donde la interacción de los elementos transreguladores de una especie con los elementos reguladores cis de la otra es responsable de la desregulación en los híbridos. De manera importante, los estudios de expresión en otras plantas diploides y poliploides, así como en animales y levaduras, utilizando una variedad de técnicas muestran que la expresión de genes no aditivos en híbridos es una ocurrencia común. El hecho de que la mayoría de estos estudios estén fuera del contexto de la heterosis sugiere que no existe un vínculo obvio entre los cambios de expresión globales debidos a la heterocigosidad y el vigor híbrido. De hecho, los cambios en la expresión génica en los híbridos pueden ser respuestas moleculares posteriores impulsadas por los efectos del crecimiento heterótico y los genes que los controlan (Schauer N et al., 2006. Nat Biotechnol 24,447-454).

[0010] Hay un intento continuo para desarrollar métodos y medios para seleccionar plantas de cultivo que muestran heterosis usando técnicas moleculares y de modelado por ordenador.

[0011] Por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional N° WO 00/42838 da a conocer métodos de correlación de información de perfil molecular con heterosis. El perfil molecular incluye la expresión de ARN o proteínas en un tejido de una planta, lo que permite la predicción del nivel de heterosis que mostrará la planta si se analiza un rasgo heterótico como el rendimiento. Esa invención describe además que la selección para marcadores de perfilado molecular dominantes, aditivos o bajo/sobredominantes, así como la selección para el número de productos de expresión en un perfil de expresión proporciona una heterosis mejorada. También se proporcionan métodos para identificar y clonar ácidos nucleicos vinculados a rasgos heteróticos y para identificar parentesco considerando los perfiles de expresión.

[0012] La Solicitud de Patente Internacional N° WO 03/050748 describe métodos, productos de programa de ordenador, y sistemas para análisis estadísticos de la expresión génica diferencial de descendencia híbrida y sus padres consanguíneos, y la identificación de genes que desempeñan un papel en la heterosis.

[0013] La Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2009/0170712 da a conocer un método para la predicción del grado de fenotipos heteróticos en las plantas. Los análisis de variación estructural del genoma y, en algunos ejemplos, la variación del número de copias se utilizan para predecir el grado de un fenotipo heterótico en las plantas. En algunos métodos, la variación en el número de copias se detecta utilizando matrices de hibridación genómica competitivas. Los métodos para optimizar las matrices también se describen, junto con los kits para producir dichas matrices, así como las plantas híbridas seleccionadas para el desarrollo en función de los resultados previstos.

[0014] La patente de EE.UU. n° 7.084.320 da a conocer métodos y medios para determinar los padres líneas de plantas endogámicas con buena capacidad de combinación, para la determinación de buenas combinaciones de líneas de plantas endogámicas parentales capaces de producir líneas híbridas con alta heterosis, y aún más para

determinar el rendimiento agronómico de diferentes líneas de plantas, que pueden realizarse *in vitro* determinando el flujo de electrones en las mitocondrias bajo condiciones de control y estrés.

5 [0015] Molinero-Rosales et al. (Planta, Springer Verlag, Vol. 218 (3), enero de 2004, p. 427-434) describe el papel de Single Flower Truss en la regulación de la transición y el mantenimiento de la floración en el tomate. Los autores muestran que SFT puede coordinar la regulación de dos procesos de desarrollo simultáneos en el brote apical de tomate, la promoción de la floración en un segmento simpodial y el desarrollo vegetativo del siguiente segmento.

10 [0016] Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, la capacidad de predecir e identificar genes que regulan heterosis que se puede utilizar en el mejoramiento de cultivos es limitada, y hay una necesidad no satisfecha, y sería altamente ventajoso tener líneas endogámicas parentales fácilmente definidas para la cría de plantas con vigor híbrido.

15 **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

[0017] La presente invención proporciona una planta de tomate híbrida de acuerdo con la reivindicación 1.

20 [0018] También se describe un enfoque novedoso para producir líneas de reproducción parental que cuando se cruzan (hibridan) producen descendientes que muestran heterosis para un rasgo deseado, particularmente rasgos relacionados con el rendimiento total. Contrariamente a los métodos sugeridos hasta ahora, que se basan en el intento de correlacionar la heterosis observada con los mecanismos moleculares, la presente invención se basa en parte en la correlación de la heterosis observada con mutaciones inducidas introducidas en el fondo de una línea parental consanguínea. En términos generales, los métodos implican la observación del rasgo fenotípico deseado en la progenie híbrida del progenitor consanguíneo y los mutantes que tienen una mutación inducida única. Esto permite la rápida identificación posterior de los genes individuales en la línea parental que, cuando se mutan, confieren el fenotipo relacionado con la heterosis deseada. Este enfoque es ventajoso sobre los métodos descritos anteriormente, ya que cada planta individual contiene solo una o un número limitado de mutaciones que pueden identificarse fácilmente y correlacionarse con el fenotipo relacionado con la heterosis.

30 [0019] También se describe un método para identificar una planta endogámica mutante capaz de conferir al menos un fenotipo relacionado con heterosis con una descendencia híbrida, que comprende:

35 a) proporcionar una primera población de plantas consanguíneas homocigotas y una segunda población de plantas mutadas homocigotas derivada de la primera población que tiene una única mutación genética y el mismo fondo genético de dicha primera población consanguínea;

b) sembrar dicha primera población consanguínea y dicha segunda población mutada en las mismas condiciones ambientales;

40 c) seleccionar plantas de dicha segunda población mutada que muestren al menos una variación fenotípica en comparación con el fenotipo de dicha primera población consanguínea, para obtener una subpoblación seleccionada de plantas híbridas parentales mutadas;

45 d) retrocruzando cada una de las plantas puras parentales mutadas de la subpoblación seleccionada obtenida en el paso (c) con una planta de dicha primera población para producir una pluralidad de poblaciones de plantas de retrocruzamiento, en donde cada una de las poblaciones de retrocruzamiento es heterocigótica únicamente en la mutación y homocigótica en el resto del genoma;

50 e) el cribado de dichas poblaciones de plantas de retrocruzamiento en busca de plantas que exhiban al menos un rasgo fenotípico superior en comparación con dicha primera población consanguínea, correlacionando así las plantas endogradas parentales mutadas individuales con plantas híbridas que muestran al menos un rasgo fenotípico superior;

55 en donde cada una de dichas plantas puras parentales mutadas de la etapa (e) confiere al menos un fenotipo relacionado con la heterosis a una descendencia híbrida.

60 [0020] El retrocruzamiento de cada una de las plantas híbridas parentales mutadas puede sustituirse con el cruce de cada una de las plantas seleccionadas en el paso (c) con una tercera población independiente de plantas consanguíneas homocigotas que tienen un fondo genético distinto para producir una pluralidad de poblaciones de plantas híbridas. Incluso en un fondo genético distinto, el fenotipo relacionado con la heterosis es evidente, lo que confirma la relevancia de la mutación y el gen identificados.

65 [0021] Los métodos para producir una población de plantas mutadas, en la que la mutación es la única variación genética en comparación con el fondo genético de la planta fuente, son conocidos en la técnica. Típicamente, producir una población mutada comprende los siguientes pasos:

a) proporcionar una planta homocigótica endogámica;

b) autofecundar la planta homocigótica consanguínea para producir semillas; u

5 c) obtener de la planta homocigótica consanguínea partes capaces de regenerar nuevas plantas;

d) inducir mutagénesis artificial en las semillas o partes de la planta;

10 e) sembrar las semillas o regenerar las partes de la planta para obtener una primera generación (M1) de plantas mutadas al azar;

f) endogamiar (autofecundar) las plantas de la etapa (e) para producir una población M2 segregándose para las mutaciones inducidas;

15 g) seleccionar plantas con una única mutación genética para producir una población de plantas homocigóticas mutadas que se diferencian de las plantas homocigótica consanguíneas solo en el sitio de mutación.

[0022] Las plantas seleccionadas se utilizan para retrocruzamiento a la línea parental original o para el cruce a una línea parental distinta para establecer retrocruzamiento o poblaciones híbridas para el cribado de heterosis como se describe anteriormente.

20

[0023] La selección de plantas con una única mutación génica se realiza típicamente puntuando una o más alteraciones fenotípicas de acuerdo con un conjunto definido de descriptores fenotípicos específicos para la especie de planta. Luego se verifica que las mutaciones seleccionadas son el resultado de una mutación en un solo gen a través de pruebas de heredabilidad de la progenie genética en generaciones M3 como se conoce en la técnica.

25

[0024] Se pueden usar varios métodos para inducir mutagénesis artificial en las semillas o partes de la planta. La mutagénesis puede ser inducida por un método seleccionado del grupo que consiste en un tratamiento químico con un compuesto mutagenizante, que incluye, por ejemplo, etil metano sulfonato (EMS); irradiación con rayos x; Irradiación UV; irradiación rápida de neutrones; T-ADN o inserción de transposones; y combinaciones de los mismos.

30

[0025] En las poblaciones de plantas, la variación fenotípica es el resultado de la variabilidad genética, así como de las condiciones ambientales en las que se cultivan las plantas. Por lo tanto, las poblaciones comparadas para la variación fenotípica de acuerdo con los métodos descritos aquí se cultivan en las mismas condiciones ambientales, de modo que el cambio fenotípico observado se debe únicamente a la variación genética cuando se compara con las líneas parentales originales no mutagenizadas. Típicamente, las poblaciones comparadas se cultivan en invernaderos agrícolas y/o ensayos de campo en múltiples condiciones ambientales y densidades de plantas para revelar tantos cambios fenotípicos como sea posible. Al tener las poblaciones comparadas el mismo fondo genético, excepto una sola mutación, las variaciones fenotípicas pueden atribuirse directamente a esa mutación, que se confirma a través de las pruebas de progenie de heredabilidad M3.

35

40

[0026] Las plantas mutantes homocigóticas que muestran cualquier variación fenotípica en comparación con las plantas isogénicas de la primera población endogámica se seleccionan para un cruce adicional (paso c), independientemente de la naturaleza de la variación fenotípica. Debe entenderse explícitamente que el fenotipo puede ser superior o inferior en términos de crecimiento de la planta, rendimiento, etc. Sorprendentemente, se describen mutaciones particulares que, cuando en una forma homocigótica dan como resultado una función génica reducida o una pérdida de la función génica que causa cambios múltiples, a menudo nocivos, para el crecimiento, la morfología y el rendimiento de las plantas; sin embargo, cuando se encuentra en una forma heterocigótica, la mutación confiere heterosis a la planta híbrida, particularmente la heterosis para el rendimiento. Por lo tanto, se seleccionan plantas mutantes homocigotas que muestran alteraciones fenotípicas inferiores en comparación con la planta no mutante.

45

50

[0027] Las plantas de las poblaciones retrocruzadas o híbridss, que son homocigóticas para la mutación de gen único, se seleccionan sólo para un rasgo fenotípico superior en comparación con el primer fenotipo de población.

55

[0028] La variación fenotípica superior está asociada preferentemente con los rasgos que afectan el rendimiento. Los rasgos que afectan el rendimiento pueden tener un efecto directo o indirecto sobre el rendimiento que se seleccionan del grupo que consiste en la tasa de crecimiento vegetativo, el peso de la planta, el tiempo de floración, el número de inflorescencias, el número de flores por inflorescencia, el momento de la fructificación o el conjunto de grano, la fruta o peso del grano, tolerancia al estrés biótico, incluida la tolerancia a patógenos y tolerancia al estrés abiótico, incluido el calor, el frío, la sequía y similares.

60

[0029] Los métodos descritos en este documento se pueden realizar con cualquier cultivo o planta que pueden mutagenizar sus semillas o partes regenerables, y, preferiblemente, una planta que se pueden seleccionar fácilmente para las mutaciones fenotípicas. La planta puede ser una planta de cultivo o una planta dicotiledónea

65

seleccionada del grupo que consiste en tomate, pimiento y soja. Alternativamente, la planta puede ser una planta monocotiledónea seleccionada del grupo que consiste en maíz, arroz, trigo y cebada. Las plantas también pueden ser plantas ornamentales o árboles de cultivo.

5 **[0030]** La mutación asociada con heterosis cuando está en forma heterocigótica puede ser genéticamente asignada de acuerdo con técnicas estándar y se identifica la alteración específica en el ADN de la única mutación génica. Por consiguiente, el método para identificar la línea de la matriz original mutante puede comprender además el mapeo de los genomas de las plantas de las poblaciones híbridas o de retrocruzamiento que muestran al menos un rasgo fenotípico superior, o su planta híbrida original, por lo que se identifica un locus genético que modula el fenotipo.

10 **[0031]** Cualquier método como se conoce en la técnica para el mapeo y la clonación del gen mutado o fragmento del mismo puede ser utilizado con las enseñanzas de la presente invención. El mapeo puede comprender, por ejemplo, analizar los polimorfismos genéticos que se segregan en la población de retrocruzamiento, análisis de ligamiento, análisis de desequilibrio de ligamiento, exploración genómica de hito de restricción (RLGS) e híbrido de radiación.

15 **[0032]** También se describen polinucleótidos aislados que comprenden mutaciones asociadas a heterosis.

[0033] También se describe un polinucleótido aislado que codifica una proteína *sft* mutada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 3. El polinucleótido puede comprender la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 4.

[0034] También se describe una planta endogámica padre mutante identificada por el método de la presente invención, la línea consanguínea mutante padre que confiere al menos un fenotipo relacionado a heterosis a una descendencia híbrida.

25 **[0035]** La línea consanguínea padre puede ser homocigótica para el gen *sft* mutante que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 4.

[0036] También se describe un método para producir planta híbrida que muestra al menos un fenotipo heterótico, que comprende:

a) proporcionar una planta consanguínea parental mutante identificada por el método descrito en el presente documento homocigótico para una única mutación en un solo gen;

35 b) proporcionar una planta consanguínea parental no mutante, homocigótica para copias de tipo salvaje del gen; y

c) cruzar (hibridar) la línea endógena parental mutante con la planta parental no mutante;

40 producir así plantas híbridas heterocigóticas que muestran al menos un fenotipo heterótico que es superior en comparación con el rendimiento fenotípico de al menos una de las plantas parentales.

[0037] La planta híbrida puede mostrar al menos un fenotipo heterótico que es superior en comparación con el rendimiento fenotípico de la mejor planta madre.

45 **[0038]** El fenotipo heterótico puede ser relacionado con el rendimiento. La planta híbrida puede mostrar fenotipos heteróticos en comparación con la planta parental no mutante. Dichos fenotipos heteróticos pueden resultar de uno o varios caracteres fenotípicos alterados en la planta heterocigótica.

50 **[0039]** La planta progenitora endogámica no mutante puede ser isogénica a la planta madre mutante. Como se usa en el presente documento, el término "isogénico a la planta parental mutante" se refiere a una planta que tiene el mismo fondo genético, excepto por la mutación del gen único. La línea parental mutante puede ser esencialmente homocigótica.

55 **[0040]** Se ha de entender explícitamente que también se describen las plantas que comprenden más de una sola mutación, cada una identificada por los métodos descritos en el presente documento. La combinación de mutaciones (pirámide) es bien conocida por los expertos en la materia. Por consiguiente, también se describen las plantas híbridas que muestran al menos un fenotipo heterótico que es superior en comparación con el rendimiento fenotípico de al menos una de las plantas progenitoras producidas por el método descrito anteriormente, que comprende más de una sola mutación.

60 **[0041]** Según la presente invención, el gen es tomate *SINGLE FLOWER TRUST* (SFT). De acuerdo con estas realizaciones, la planta de tomate híbrida heterocigótica comprende una copia del gen *SFT* de tipo salvaje estructuralmente intacta y funcional y una copia *SFT* mutada, en donde la mutación en la copia *SFT* es tal que reduce la función del gen *SFT* cuando es homocigótica; dicha planta de tomate heterocigota presenta una heterosis cuantitativa con respecto a al menos un parámetro relacionado con el rendimiento en comparación con una planta

homocigótica que tiene dos copias funcionales de tipo salvaje del gen *SFT*.

[0042] El gen de tipo salvaje *SFT* codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1. El gen *SFT* de tipo salvaje comprende una secuencia de ácido nucleico como se establece en la SEQ ID NO: 2.

[0043] Según otras realizaciones, el gen *SFT* mutado codifica una proteína que tiene el conjunto de secuencias de aminoácidos en la SEQ ID NO: 3. De acuerdo con una realización, el gen comprende una secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO: 4.

[0044] De acuerdo con otras realizaciones, el gen *SFT* mutado codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 5. De acuerdo con una realización, el gen comprende una secuencia de ácido nucleico como se establece en la SEQ ID NO: 6.

[0045] De acuerdo con realizaciones todavía adicionales el gen *SFT* mutado codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 7. De acuerdo con una realización, el gen comprende una secuencia de ácido nucleico como se indica en la SEQ ID NO: 8.

[0046] La planta es una planta de tomate (*Solanum lycopersicum*). Las plantas híbridas se pueden producir mediante el método descrito en el presente documento.

[0047] También se describe una planta híbrida que comprende un heterocigoto de tipo salvaje de copias del gen *SFT* estructuralmente intacto y funcional y una copia *SFT* mutante, en donde la mutación en la copia *SFT* es tal que reduce la función del gen *SFT* cuando sea homocigótico; en donde la planta heterocigótica muestra una heterosis cuantitativa con respecto a al menos un parámetro relacionado con el rendimiento en comparación con una planta homocigótica que tiene dos copias funcionales de tipo salvaje del gen *SFT*.

[0048] La presente invención proporciona una planta de tomate híbrido según la reivindicación 1, que comprende un gen *SFT* tipo salvaje que tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 2 y un gen *SFT* mutante que tiene una secuencia de ácido nucleico preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 8. De acuerdo con realizaciones típicas adicionales, el gen *SFT* mutante comprende la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en la SEQ ID NO: 4.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención quedarán claros a partir de la siguiente descripción y dibujos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0049]

FIG. 1 muestra una ilustración esquemática del método para identificar plantas consanguíneas mutantes que confieren al menos un fenotipo relacionado con heterosis a su descendencia híbrida.

FIG. 2 muestra el rendimiento total de plantas híbridas heterocigotas para una mutación inducida. Las plantas híbridas que muestran un rendimiento total significativamente mayor en comparación con la matriz M82 están marcadas con asteriscos.

FIG. 3 muestra la heterosis para el rendimiento causado por la heterocigosidad para la mutación *sft-e4537* (Fig. 3A), y la heterocigosidad en una segunda mutación llamada *n5568* (Fig. 3B).

FIG. 4 muestra la heterosis para el rendimiento total de fruta causada por la heterocigosidad para *sft-e4537*, *sft-n7187* y *sft-stop* en el fondo M82 en comparación con M82, las líneas mutantes homocigotas parentales y el híbrido comercial AB2.

FIG. 5 muestra la comparación de Brix-Yield (g por m²) de los híbridos isogénicos M82xE6203 y M82*sft* x E6203 en ancho (Fig. 5A) y espaciado denso (Fig. 5B) en comparación con las líneas parentales y el híbrido comercial AB2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0050] La presente invención aborda la necesidad continua de herramientas para la producción de la mejora de los cultivos agrícolas. Particularmente, la presente invención proporciona métodos para vincular una mutación particular con heterosis. Estas mutaciones se usan para producir plantas híbridas que tienen un vigor de planta mejorado, particularmente plantas que tienen parámetros de rendimiento mejorados.

Definiciones

5 **[0051]** El término "planta" se usa en el presente documento en su sentido más amplio. Incluye, pero no se limita a, cualquier especie de planta leñosa, herbácea, perenne o anual. También se refiere a una pluralidad de células vegetales que se diferencian en gran medida en una estructura que está presente en cualquier etapa del desarrollo de una planta. Tales estructuras incluyen, pero no se limitan a, una raíz, tallo, brote, hoja, flor, pétalo, fruta, etc.

10 **[0052]** Los términos "heterosis" y "vigor de la planta" se usan en el presente documento en su significado común tal como se conoce en la técnica, se hace referencia al mayor vigor u otras cualidades superiores derivadas del cruzamiento de plantas genéticamente diferentes. "Fenotipo relacionado con heterosis" significa un rasgo observable en una planta donde el fenotipo exhibido en plantas híbridas es más deseable cuando se compara con el fenotipo correspondiente exhibido en plantas parentales homocigóticas.

15 **[0053]** Tal como se utiliza aquí, el término "fenotipo" se refiere generalmente a cualquier carácter observable o la propiedad de una planta. La propiedad observable depende del genoma del organismo y puede caracterizarse además como modulado por un factor no genético, una interacción entre dos o más factores no genéticos, una interacción entre un locus genético y un factor no genético, o una interacción entre dos o más loci genéticos y factores no genéticos. Un factor no genético comprende una condición o exposición ambiental, por ejemplo, condiciones de crecimiento, estrés biótico y abiótico. El término "rasgo", como se usa en el presente documento, se refiere a un fenotipo característico.

20 **[0054]** Como se usa en este documento, los términos "líneas de plantas madre" o "plantas madre" se refiere a líneas abiertas y cerradas polinizadas, puras y estables para los rasgos deseados por ciclos de la autopolinización y la siembra. El término "planta híbrida" se refiere a una planta que resulta de un cruce entre individuos genéticamente diferentes, típicamente dos líneas parentales distintas.

25 **[0055]** Los términos "primero" y "segundo", por ejemplo, tal como se usa en el presente documento para describir diversas poblaciones de plantas se incluyen para mayor claridad de la descripción y no pretenden ser limitantes.

30 **[0056]** Los términos "mutación" y "mutagénesis" se usan aquí de forma intercambiable para referirse a un método para inducir una o más modificaciones genéticas en material de ácido nucleico celular. El término "mutación", como se usa aquí, se refiere a cualquier alteración del ADN a una forma que sea diferente en comparación con su forma natural. Las modificaciones genéticas representativas incluyen inserciones de nucleótidos, deleciones, sustituciones y combinaciones de las mismas, y pueden ser tan pequeñas como una sola base o tan grandes como decenas de miles de bases.

35 **[0057]** Los términos "mapeo" y "mapeo de genes" se utilizan indistintamente para referirse a la resolución progresiva de la secuencia genómica que confiere un fenotipo. Un experimento de mapeo típico emplea el análisis de ligamiento de un locus diana y polimorfismos genéticos. Los resultados de un método de mapeo pueden expresarse como unidades de mapa o centimorgans.

40 **[0058]** El término "polimorfismo" se refiere a la ocurrencia de dos o más secuencias alternativas genéticamente determinadas o alelos en una población. Una diferencia alélica puede ser tan pequeña como un par de bases.

45 **[0059]** El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende las secuencias necesarias para la producción de ARN o un polipéptido de codificación. Un polipéptido puede codificarse por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier parte de la misma. El término "partes del mismo" cuando se usa en referencia a un gen se refiere a fragmentos de ese gen. Los fragmentos pueden variar en tamaño desde unos pocos nucleótidos hasta la secuencia del gen completo menos un nucleótido. Por lo tanto, "una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos una parte de un gen" puede comprender fragmentos del gen o el gen completo.

50 **[0060]** El término "gen" también abarca las regiones codificantes de un gen estructural e incluye secuencias localizadas adyacentes a la región codificante en ambos extremos 5' y 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb en cada extremo de tal manera que el gen corresponde a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias que están localizadas en 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas en 5'. Las secuencias que están ubicadas en 3' o aguas abajo de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas en 3'.

55 **[0061]** Tal como se utiliza aquí, el término "alelo" se refiere a un miembro de un par o una serie de genes que ocupan una posición específica en un cromosoma específico.

60 **[0062]** Tal como se utiliza aquí, el término "copia funcional" se refiere al gen de tipo salvaje presente en forma heterocigótica en las plantas híbridas heteróticas de la invención. Este término se refiere al gen de *SFT* funcional y de tipo salvaje de tomate que tiene la secuencia de ácido nucleico que se encuentra en la SEQ ID NO: 2.

65 **[0063]** El término "reducción de la función de genes *SFT*" como se usa aquí se refiere a una mutación en el gen *SFT*

que cuando están presentes en forma homocigótica provoca la floración desfavorable y arquitectura de la planta debido a la pobre producción de flores/frutas y un gran hábito de planta arbustiva resultante de las inflorescencias vegetativas "indeterminadas" que inhiben la reiteración de brotes que producen hojas vegetativas y brotes florales que producen flores (simpodiales).

5 **[0064]** Tal como se utiliza aquí, el término "ortólogo" se refiere a cualquier gen que se encuentra en dos o más especies que se pueden remontar a un ancestro común.

10 **[0065]** Tal como se utiliza aquí, el término expresión "dominante" para un producto de expresión (es decir, un polinucleótido o polipéptido) se refiere a la situación en la que la expresión del producto en una progenie se diferencia de uno de los padres, pero no difiere de la segunda matriz. El término "expresión aditiva" para un producto de expresión se refiere a la situación en la que la expresión del producto en una progenie se encuentra dentro del rango de los dos padres (y puede o no diferir significativamente de ambos padres). Los términos "sobredominante" o "sobredominancia" se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a la situación en la que la expresión de un producto de expresión en una progenie difiere de ambos progenitores y se encuentra fuera del rango de los dos progenitores por encima del valor paterno más alto. Además, el término "diferir" cuando se refiere a valores depende de las tecnologías que se utilizan y se define dentro de los límites de detección de tales tecnologías.

15 **[0066]** Los términos "polinucleótido", "secuencia de polinucleótido", "secuencia de ácido nucleico" y "polinucleótido aislado" se usan indistintamente en este documento. Estos términos abarcan secuencias de nucleótidos y similares. Un polinucleótido puede ser un polímero de ARN o ADN o híbrido del mismo, que sea de cadena simple o doble, lineal o ramificado, y que opcionalmente contenga bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas. Los términos también abarcan los híbridos de ARN/ADN.

20 **[0067]** Una molécula "aislada" de ácido nucleico es una que está separada sustancialmente de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico (es decir, secuencias que codifican otros polipéptidos). Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de algunas de las secuencias que flanquean naturalmente al ácido nucleico (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en su replicación que se produce de forma natural. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado se considera aislado. Un ácido nucleico también se considera aislado si ha sido alterado por intervención humana, o colocado en un lugar o ubicación que no es su sitio natural, o si se introduce en una célula por agroinfección. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", como una molécula de ADNc, puede estar libre de algunos de los otros materiales celulares con los que está naturalmente asociado, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros químicos cuando se produce químicamente. sintetizado

25 **Modos preferidos para realizar la invención.**

30 **[0068]** El vigor híbrido, o heterosis, de plantas heterocigóticas habían sido descritos por Darwin. La primera exploración intelectual práctica en heterosis comenzó en el comienzo del siglo 20 por el descubrimiento de que inter-cruzar diferentes variedades endogámicas de maíz de pobre rendimiento producía híbridos con el crecimiento y rendimiento superior. Pasaron 25 años más hasta que se comercializaron los primeros híbridos comerciales de doble cruz, y algunos años más hasta que las líneas puras se volvieron lo suficientemente vigorosas como para producir una cantidad suficiente de semillas. En ese momento, las semillas híbridas de un solo cruce superior comenzaron a dominar el mercado de semillas de maíz, lo que demuestra el poder de la heterosis. El éxito de la producción híbrida de F1 ha aumentado la producción de alimentos en muchas regiones del mundo y ha aumentado dramáticamente el rendimiento de 15 a 50%, dependiendo del cultivo (Duvick D N., 2001. *ibid*).

35 **[0069]** La heterosis es un rasgo cuantitativo con un modo complejo de herencia debido a su efecto en múltiples procesos de desarrollo. Las plantas de cultivo han sido los modelos primarios en los intentos de descomponer la heterosis en componentes genéticamente trazables, ya que se seleccionó la parentalidad parental por su máxima capacidad de combinación heterótica, y la creación de poblaciones genéticas controladas ha permitido un fenotipado cuantitativo robusto. El mayor desafío en la investigación de la heterosis se centra en identificar los genes que impulsan el proceso y establecer de manera inequívoca una asociación directa entre los fenotipos heteróticos y los factores moleculares que los subyacen.

40 **[0070]** Se describe un nuevo enfoque para identificar genes relacionados con la heterosis, basado en la producción de una población mutada de plantas y atribuir una cierta mutación a un fenotipo heterótico cuando una mutación se encuentra en el estado heterocigótico. Además, se describe que las mutaciones que tienen efectos negativos en la planta cuando están en forma homocigótica pueden conferir heterosis cuando están en forma heterocigótica, particularmente en rasgos que afectan, directa o indirectamente, el rendimiento total.

45 **[0071]** Por lo tanto, se describe aquí un método para identificar una planta endogámica mutante madre que confiere al menos un fenotipo relacionado con heterosis con una descendencia híbrida.

50 **[0072]** Los principios del método se ilustran esquemáticamente en la Figura 1. La primera etapa del método se basa en el material de las plantas homogéneas endogámicas de una especie dada de partida. Esta línea parental se elige

como base genética para una mutagénesis artificial inducida, como por ejemplo a través de un tratamiento químico con compuestos como el etil metano sulfonato (EMS), la irradiación con rayos X, la radiación UV, la radiación de neutrones rápida, el T-ADN o la inserción de transposón. Se pueden inducir mutaciones en cualquier parte de la planta que pueda regenerarse a una planta completa. Típicamente, las mutaciones son inducidas en las semillas de las plantas. En ciertos cultivos, el polen haploide o diploide puede servir como material de partida para una población de plantas mutadas. Alternativamente, los cultivos de tejidos vegetales están expuestos a la inducción de mutaciones. Las partes de plantas mutadas se utilizan para generar una serie de plantas mutadas aleatoriamente de primera generación (M1). Las plantas M1 mutadas son endogamadas que luego dan lugar a plantas de progenie (M2) donde se pueden identificar mutantes individuales en poblaciones segregantes.

[0073] A continuación, se realiza un cribado de mutantes y selección de plantas que muestra un cambio en uno o más caracteres fenotípicos que los distinguen de la línea parental. Los rasgos asociados con el rendimiento son particularmente seguidos, pero el cribado y selección no está restringida a tales rasgos. Es importante destacar que estos cambios en el carácter no tienen que estar relacionados con, o afectar, a los componentes de rendimiento directamente. La detección de mutantes se puede realizar cuando las plantas se cultivan en condiciones de invernadero o de campo. La población de las plantas mutadas seleccionadas, o la "biblioteca de mutaciones", se usa para identificar mutaciones relacionadas con la heterosis. Debe entenderse explícitamente que en esta etapa, se seleccionan plantas que muestran cualquier cambio fenotípico en comparación con las plantas parentales no mutadas. Sorprendentemente, la presente invención ahora describe que los fenotipos delirantes, particularmente de productividad reducida, observados en la planta mutada homocigótica para la mutación, se convierten en fenotipos heteróticos superiores cuando la planta es heterocigótica a la misma mutación.

[0074] El método descrito en este documento puede ser empleado utilizando bibliotecas de mutación conocidas, por ejemplo la biblioteca de mutación de tomate isogénica en el fondo genético de la M82 endogámica descrita en la sección de ejemplo a continuación. Adicional o alternativamente, se pueden producir nuevas bibliotecas de mutación como se describe aquí anteriormente.

[0075] Los métodos de mutagénesis de emplearse de acuerdo con la presente descripción son sustancialmente al azar de tal modo que una modificación genética puede ocurrir en cualquier posición de nucleótido disponible dentro del material de ácido nucleico a ser mutagenizado, es decir, no hay preferencia o aumento de la frecuencia de ocurrencia de mutagénesis en particular, secuencias de nucleótidos.

[0076] Cualquier agente mutagénico tal como se conoce en la técnica puede ser de uso, incluyendo, pero no limitado a la luz ultravioleta, radiación de rayos X, radiación gamma, N-etilo-N-nitrosourea (ENU), metilnitrosourea (MNU), procarbazona (PRC), trietilo melamina (TEM), monómero de acrilamida (AA), clorambucilo (CHL), melfalán (MLP), ciclofosfamida (CPP), dietil sulfato (DES), etil metano sulfonato (EMS), metilo metano sulfonato (MMS), 6-mercaptopurina (6-MP), mitomicina-C (MMC), N-metilo-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), $^3\text{H}_2\text{O}$, y uretano (UR). También se puede utilizar la transferencia mediada por *Agrobacterium* (ADN-T) o la inserción de transposón.

[0077] La frecuencia de la modificación genética a la exposición a uno o más agentes mutagénicos puede ser modulada por la dosis y/o la repetición de tratamiento variable, y se pueden adaptar para una especie aplicación/de planta particular. Por ejemplo, si la detección fenotípica posterior implica la identificación de un fenotipo raro, entonces se puede seleccionar una frecuencia de modificación genética mediante la cual se inducen múltiples mutaciones en cada cromosoma. De manera similar, si la biblioteca se usará para detectar un fenotipo de diferenciación más general, entonces la dosis y la administración de mutágenos pueden variar para generar un número relativamente menor de modificaciones genéticas por cromosoma. La dosis de tratamiento y el régimen pueden no inducir citotoxicidad sustancial.

[0078] Los rasgos que afectan el rendimiento que tienen un efecto directo sobre el rendimiento pueden seleccionarse del grupo que consiste en, entre otros, la tasa de crecimiento vegetativo, el peso de la planta, el tiempo de floración, el número de inflorescencias, el número de flores por inflorescencia, el momento de la fruta o conjunto de grano y peso de la fruta o grano. Los rasgos que afectan el rendimiento que tienen un efecto indirecto sobre el rendimiento también pueden seleccionarse del grupo que consiste en la tolerancia al estrés biótico, incluida la tolerancia a patógenos y la tolerancia al estrés abiótico, incluido el calor, el frío, la sequía y similares.

[0079] Los mutantes de clases fenotípicas aleatorias únicas o múltiples que representan mutaciones heredadas de genes únicos que muestran un fenotipo alterado como se describió anteriormente se seleccionan identificando una o más alteraciones fenotípicas de acuerdo con un conjunto definido de descriptores fenotípicos específicos de especies de plantas, para luego verificar que se seleccionaron las mutaciones son el resultado de una mutación en un solo gen a través de pruebas de heredabilidad de la progenie genética en generaciones M3 y, posteriormente, se cruzan al progenitor original no mutagenizado para generar una semilla "híbrida mutante". Esta semilla porta una copia mutada de un gen y una copia funcional del mismo gen en la posición genómica correspondiente (es decir, alélica), lo que la hace heterocigótica para la mutación. Los conjuntos restantes de genes y segmentos cromosómicos intergénicos son homocigotos. Alternativamente, la planta mutada seleccionada se cruza con un progenitor consanguíneo no relacionado. La progenie de la semilla producida es heterocigótica para la mutación y heterocigótica para los conjuntos restantes de genes en un sentido híbrido tradicional. Varias mutaciones

identificadas de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación pueden combinarse en una planta parental mutante. En este caso, la progenie híbrida producida será heterocigótica para cada una de las mutaciones.

5 **[0080]** Las semillas híbridas mutantes se ensayaron a continuación en ensayos de invernadero y/o en el campo agrícola en múltiples entornos y densidades de siembra y se comparan directamente a la línea parental homocigótica que no lleva una copia mutada del gen. Los rasgos deseados (tales como, por ejemplo, rasgos relacionados con el rendimiento) se miden de una manera completa, replicada y aleatoria, y se realizan análisis estadísticos apropiados para determinar cambios significativos en los rasgos fenotípicos. Los híbridos mutantes que muestran heterosis se seleccionan para una evaluación adicional, incluida la evaluación de rasgos adicionales, particularmente rasgos relacionados con el rendimiento, y bajo condiciones ambientales adicionales. Los híbridos que mantienen el fenotipo heterótico para el rasgo deseado comprenden una mutación relacionada con la heterosis. Las plantas híbridas homocigotas parentales de estos híbridos son la fuente de la mutación relacionada con la heterosis, y están identificadas dentro de la población mutada original.

15 **[0081]** Las plantas endogámicas mutantes madre identifican de acuerdo con las enseñanzas de la presente descripción, que confieren al menos un fenotipo relacionado a heterosis a su descendencia híbrida, pueden ser utilizadas para la producción comercial de la planta híbrida deseada sin la necesidad de identificar la mutación específica relacionada con la heterosis.

20 **[0082]** Sin embargo, de acuerdo con ciertos aspectos se identifican las mutaciones relacionadas a heterosis. Las mutaciones pueden ser mapeadas y clonadas.

25 **[0083]** Las técnicas para el mapeo de genes son bien conocidas para un experto en la técnica, incluido el análisis de enlace (por ejemplo, Wells C y Brown S D., 2000. Mamm Genome 11, 472-477), análisis de desequilibrio de enlace (Kruglyak L., 1999 Nat Genet 22, 139-144), exploración genómica de hito de restricción (RLGS) (Akiyoshi S et al., 2000. Mamm Genome 11, 356-359), y mapeo de radiación híbrida (Schuler GD et al., 1996. Science 274, 540-546; Van Etten WJ et al., 1999. Nat Genet 22, 384-387). Se puede usar cualquier técnica de mapeo adecuada, y un experto en la técnica apreciará que ninguna elección particular es esencial o una limitación del objeto reivindicado actualmente.

30 **[0084]** También se describen las mutaciones en el gen de tomate *SFT* que reducen su función cuando sean homocigóticas, y cuantitativamente modulan heterosis para rendimiento cuando en la presencia de una copia funcional del gen *SFT* en una forma heterocigótica. También se describen ortólogos mutados del gen *SFT* de otras especies de cultivos que pueden modular la heterosis para el rendimiento cuando están presentes en la condición heterocigótica.

35 **[0085]** Los procesos de crecimiento de las plantas dependen de la acción simultánea de las señales ambientales y las respuestas innatas. En las plantas con flores, denominadas angiospermas, la inducción de la floración marca una importante transición del crecimiento vegetativo al reproductivo, lo que resulta en el desarrollo de flores, frutos y semillas. Este cambio en el desarrollo, que es un determinante importante del éxito reproductivo y el potencial de rendimiento del cultivo, se desencadena principalmente por cambios en la duración del día, lo que se conoce como fotoperiodismo. La floración en muchas especies es una consecuencia de días cortos o días largos, y algunas especies son neutrales (Thomas B y Vince-Prue D., 1997. En: Photoperiodism in plants. New York: Academic Press). Independientemente de a qué clase pertenece una planta, las respuestas internas innatas conducen a cambios en la diferenciación celular entre grupos de células madre pluripotentes de los meristemas apicales que dan lugar a todos los órganos de la planta. Los estudios dirigidos a descifrar los mecanismos moleculares responsables del cambio de un meristema vegetativo a un meristema reproductivo han llevado a la identificación de una molécula móvil llamada "florigen", que se produce en las hojas bajo fotoperíodos inductivos y se transloca para disparar los meristemas apicales (SAM) para inducir la floración.

40 **[0086]** Los estudios genéticos y moleculares en *Arabidopsis*, que es una planta facultativa de días largos, mostraron que los mutantes en un gen llamado *FLORACIÓN LOCUS T (FT)* fueron de floración tardía y fueron objeto de un gen llamado *CONSTANS (CO)*, que es bajo la influencia del reloj circadiano. Sin embargo, aunque originalmente se sugirió que el *CO* era florigeno, su capacidad para inducir la floración no era universal.

45 **[0087]** Los estudios independientes en *Arabidopsis*, arroz, tomate y han puesto de manifiesto que *FT* y sus ortólogos en otras especies funcionan como la señal de floración móvil. La evidencia directa que implicaba a *FT* como un componente genético y molecular importante de florigen provino del tomate, donde se demostró que la sobreexpresión del ortólogo de *FT*, *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)*, podría inducir la floración en los mutantes *SFT* de tomate y, además, podría inducir la floración cuando está presente como un gen heterólogo en un cultivo de tabaco de floración tardía (Kobayashi Y y Weigel D., Genes Dev. 2007. 21 (19), 2371-84).

50 **[0088]** Otros estudios demostraron que *FT* y sus ortólogos tienen efectos dramáticos y universales sobre el tiempo de floración, que a su vez, regula la arquitectura de la planta, y otros rasgos agrónomicamente importantes directamente relacionados con rendimiento en plantas de cultivo. Por ejemplo, en el tomate, los mutantes *SFT* son de floración tardía y alteran el patrón de crecimiento compuesto reiterado de la planta de tomate, que proporciona la

base para el rendimiento (Lifschitz E y Eshed Y., 2006. J Exp Bot 57, 3405-3414). El tomate, como todos los miembros de la familia *Solanaceae*, produce un sistema compuesto de brotes "simpodiales" al alternar entre la terminación del crecimiento y la renovación de los SAM, de modo que el crecimiento del tomate es modular y experimenta numerosas transiciones vegetativas a florales durante el crecimiento, dando como resultado una planta compuesta por cientos de ramas, inflorescencias y flores. Esencialmente, la producción de flores y frutos en tomate se basa en la regulación genética de dos eventos de floración: el número de hojas generadas hasta que se forma la inflorescencia primaria en los brotes primarios y axilares, y el número de hojas entre las inflorescencias nacidas del crecimiento simpodial.

[0089] Se ha encontrado que dos genes principales regulan el crecimiento simpodial en tomate. El primero es *SELF PRUNING* (*SP*), que es un ortólogo de *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*) de *Arabidopsis* y *CENTRORADIALIS* (*CEN*) en *Antirrhinum*. La función normal de *SP* es reprimir la floración. Por lo tanto, los mutantes *sp* florecen más rápidamente, lo que causa una reducción progresiva en el número de hojas dentro de las unidades simpodiales, de modo que la planta termina finalmente con dos inflorescencias consecutivas (Pnueli L et al., 1998. Development 125, 1979-1989).

[0090] La *SFT* fue el segundo gen que se encontró que tuvo un gran impacto en el crecimiento de brotes simpodiales, ya que los mutantes *sft*, además de ser de floración tardía, transforman la inflorescencia normal del compuesto de tomate en un brote vegetativo indeterminado en constante crecimiento donde se separan las flores individuales en espacio por hojas (Lifschitz F et al., 2006. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 103, 6398-6403). Esta indeterminación impide la liberación del primer lanzamiento simpodial debido a un fallo en la liberación de la dominancia apical, lo que impide la producción de unidades simpodiales reiteradas.

[0091] Al menos cuatro mutaciones *SFT* independientes se han identificado y utilizado para clonar el gen *SFT*. Curiosamente, se descubrió que *SFT* era un miembro de la misma familia de genes que *SP/TFL1/CEN*. Todos estos productos genéticos están relacionados con una proteína de unión a fosfatidiletanolamina que puede ser un componente de los complejos de membrana involucrados en la producción de señales o un coactivador transcripcional.

[0092] Como una planta de cultivo, el tomate ha sido criado para tener características agronómicas beneficiosas, especialmente los fenotipos relacionados con el tiempo de floración, arquitectura de la planta, la producción de frutas y tamaño del fruto. De hecho, la mutación *sp* se ha convertido en el cambio genético más importante en el desarrollo del procesamiento de variedades de tomate, debido a que el hábito de crecimiento "determinado" que confiere la mutación *sp* facilita la recolección mecánica y la reproducción de una maduración uniforme de la fruta (Pnueli et al., 1998. *ibid*). En contraste, los mutantes homocigóticos de *SFT* tienen un impacto negativo en la floración y la arquitectura de la planta debido a la escasa producción de flores/frutos y al hábito de plantas tupidas resultantes de las inflorescencias vegetativas indeterminadas que inhiben la reiteración de unidades simpodiales. Por lo tanto, las cuatro mutaciones conocidas de *SFT* se han estudiado estrictamente desde una perspectiva de desarrollo, destacando el papel de *SFT* en el tiempo de floración y los procesos de desarrollo relacionados (Lifschitz y Eshed, 2006. *ibid*; Lifschitz et al., 2006. *ibid*).

[0093] Sorprendentemente, empleando el método descrito en el presente documento para la identificación de plantas mutantes que inducen heterosis con una biblioteca de mutación de tomate, ahora se da a conocer que las plantas de tomate heterocigóticas para una mutación en el gen *SFT* muestran aumento del rendimiento a través de heterosis de un solo gen.

[0094] Tres mutaciones independientes de *SFT* fueron identificadas que pueden causar la heterosis de gen único. *sft-4537*, que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 6, que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5; *sft-7187*, que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 8, que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7; y *sft-stop*, que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 4, que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3.

[0095] La mutación en *sft-4537* es un solo cambio de pares de bases en la posición nucleotídica 194 (de c a t) que resulta en un único cambio de aminoácidos de treonina (T) a isoleucina (I).

[0096] La mutación en *sft-7187* es una delección de dos pares de bases en las posiciones 466-467 del gen *SFT* tipo salvaje (SEQ ID NO: 2) que causa un desplazamiento del marco y una parada de aguas abajo del codón que trunca el extremo C-terminal de la proteína *SFT*.

[0097] Estas dos mutaciones fueron descritas anteriormente en una publicación utilizando *SFT* mutantes homocigóticos que más tarde florecieron en comparación con una planta no mutante para aislar el gen *SFT* y estudiar su función como un componente de la señal de floración móvil "florigen" (Lifschitz, et al, 2006. *ibid*). Sin embargo, aunque esta publicación reveló estas secuencias, su función de la moderación cuantitativa de la heterosis de rasgos relacionados con el rendimiento cuando se encuentra en presencia de una copia funcional del gen *SFT* (es decir, cuando se encuentra en una condición heterocigótica), no se describió previamente.

[0098] La mutación en *sft-parada* es un solo cambio de pares de bases en la posición 148 (de c a t) que causa un codón de parada temprana que trunca los últimos dos tercios de la proteína SFT. Esta mutación y su función se describen en la presente solicitud por primera vez.

[0099] Cuando está en forma homocigótica, las tres mutaciones causan cambios fenotípicos similares en el tiempo de floración de plantas tal como se describe anteriormente (Lifschitez et al, 2006. *ibid*). Estos cambios dan como resultado plantas agronómicamente inferiores en comparación con las plantas normales que no tienen la mutación debido a la pérdida del crecimiento simpodial, el crecimiento vegetativo extremo y el rendimiento reducido. La presente invención ahora describe que cuando están en forma heterocigótica estas mutaciones conducen a una mejora en el rendimiento, como se ejemplifica a continuación. Sin desear estar limitado por ninguna teoría específica o mecanismo de acción, el efecto fenotípico heterótico se puede atribuir a la sobredominancia (ODO), en la que se muestra un rendimiento sinérgico superior de los alelos heterocigotos ubicados en el mismo locus.

[0100] Por lo tanto, se describe un polinucleótido aislado que codifica una proteína *SFT* mutada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3. De acuerdo con ciertas realizaciones, el polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 4.

[0101] También se describe una planta consanguínea parental mutante identificada por el método descrito en el presente documento, la línea endógena parental mutante que confiere al menos un fenotipo relacionado con heterosis a una descendencia híbrida.

[0102] La línea endogámica original puede ser homocigótica para el gen *SFT* mutante que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 4.

[0103] También se describe un método para producir planta híbrida que muestra al menos un fenotipo heterótico, que comprende:

- a) proporcionar una planta consanguínea parental mutante identificada por el método descrito en el presente documento, homocigótica para una única mutación en un solo gen;
- b) proporcionar una planta consanguínea parental no mutante, homocigótica para copias de tipo salvaje del gen; y
- c) cruzar (hibridar) la línea endógena original mutante con la línea principal no mutante;

producir de este modo plantas híbridas heterocigóticas que muestran al menos un fenotipo heterótico que es superior en comparación con el rendimiento fenotípico de al menos una de las plantas parentales.

[0104] La planta híbrida puede mostrar al menos un fenotipo heterótico que es superior en comparación con el rendimiento fenotípico de la mejor planta madre.

[0105] Según la presente invención, el gen es el gen de tomate *SFT*. De acuerdo con estas realizaciones, la planta de tomate híbrida heterocigótica comprende una copia del gen *SFT* de tipo salvaje estructuralmente intacta y funcional y una copia *SFT* mutada, en donde la mutación en la copia *SFT* es tal que reduce la función del gen *SFT* cuando es homocigótica; dicha planta heterocigótica presenta una heterosis cuantitativa con respecto a al menos un parámetro relacionado con el rendimiento en comparación con una planta homocigótica que tiene dos copias funcionales de tipo salvaje del gen *SFT*.

[0106] De acuerdo con ciertas realizaciones, el gen *SFT* de tipo salvaje codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1. De acuerdo con una realización, el gen *SFT* de tipo salvaje comprende una secuencia de ácido nucleico como se indica en la SEQ ID NO: 2.

[0107] Según otras realizaciones, el gen *SFT* mutado codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7. De acuerdo con realizaciones adicionales, el gen mutado comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8.

[0108] Según ciertas realizaciones típicas, la presente invención proporciona una planta de tomate híbrida heterocigótica para el gen *SFT*, que comprende un gen *SFT* de tipo salvaje que tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 2 y un gen *SFT* mutante que tiene una secuencia de nucleótido ácido expuesta en una SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8, en la que la planta híbrida tiene un rendimiento mayor en comparación con una planta seleccionada del grupo que consiste en un homocigoto para el gen *SFT* y una planta homocigótica para el gen *sft*.

[0109] Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente algunas realizaciones de la

invención. Sin embargo, no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del amplio alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: identificación de plantas consanguíneas mutantes que proporcionan un fenotipo relacionado con la heterosis

[0110] La planta de cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) se utilizó por primera vez para identificar plantas progenitoras mutantes que confieren al menos un rasgo relacionado con la heterosis a una descendencia híbrida. Un inventor de la presente invención y colaboradores han generado previamente una "biblioteca de mutación" isogénica de tomate en el fondo genético de la variedad M82 procesada de tomate (Menda NY et al., 2004. Plant J 38, 861-72). Un total de 13.000 familias M2, derivadas de etil metano sulfonato (EMS), tratamiento químico y mutagénesis de neutrones rápidos de semillas, se fenotiparon en condiciones de campo y se clasificaron en un catálogo morfológico que incluía 15 categorías primarias y 48 secundarias. Se han identificado más de 3.000 mutaciones, algunas de las cuales representan nuevos alelos de fenotipos descritos previamente de la colección de mutantes monogénicos del Centro de Recursos de Genética del Tomate (TGRC: <http://tgrc.ucdavis.edu>). Muchas mutaciones pertenecen a más de una categoría y, por lo tanto, tienen efectos pleiotrópicos en el crecimiento de las plantas. Se puede buscar y acceder a los mutantes en Solanaceae Genome Network (SGN) en un sitio llamado "Los genes que producen los tomates" (<http://zamir.sgn.cornell.edu/mutants/>).

[0111] De esta base de datos, se seleccionaron 35 mutantes individuales de un solo gen que afectan a varias categorías de crecimiento de plantas para la evaluación de híbridos mutantes por retrocruzamiento de la variedad M82. La variedad M82 no mutagenizada, y los mutantes homocigóticos sirvieron como control. Se sembraron quince réplicas de todos los heterocigotos mutantes en un diseño de bloques al azar en condiciones de campo agrícola (Akko, Israel). En la madurez (-80-100% de fruta madura (roja)), las plantas se cosecharon y se midieron para los siguientes rasgos relacionados con el rendimiento: 1. Peso de la planta; 2. Peso de la fruta verde; 3. Peso de la fruta roja; 4. Rendimiento total; 5. Peso de una sola fruta; 6. Número total de frutas. Los datos se recopilaban de 12 réplicas para cada genotipo y se compararon estadísticamente mediante el programa JMP 6.0. En todos los casos, los rendimientos de mutantes homocigóticos fueron iguales a M82 o significativamente más bajos. Seis heterocigotos mutantes mostraron rendimientos estadísticamente significativos más altos que M82 ($p < 0,05$; prueba t de Student): e0137; e2268ml; e4130m2; e4537ml; n1902ml; y n5568 (Figura 2). Los efectos individuales oscilaron entre el 15-87%.

[0112] Este ejemplo ilustra que la heterosis se puede lograr a partir de un único gen cuando una copia (alelo) está mutado a pesar de los restantes genes y segmentos cromosómicos intergénicos restantes por todas las consideraciones prácticas homocigóticas para el genotipo M82. Las plantas progenitoras de los heterocigotos descritos anteriormente se pueden usar para producir plantas híbridas con mayor rendimiento.

Ejemplo 2: Identificación de mutaciones relacionadas con heterosis

[0113] La "biblioteca de mutación" descrita anteriormente y los identificados seis mutantes que muestran efectos de heterosis se utilizaron para la identificación de mutaciones particulares que confieren heterosis cuando está en forma heterocigótica.

[0114] Entre estos seis híbridos mutantes, los heterocigotos mutantes *sft-e4537/+* y *s-n5568/+* mostraron los efectos sobredominantes más fuertes (87% y un rendimiento del 39% más alto que el mejor padre, respectivamente, la Figura 3). El efecto sobredominante se atribuyó a la heterocigosidad con mutaciones en los genes que codifican a los ortólogos de *Arabidopsis* de FT (tomate *SFT*) y *WOX9*, respectivamente.

[0115] El gen *SFT* fue identificado anteriormente y se muestra para codificar una proteína que funciona como un componente principal de florigen (Lifschitz et al., 2006. *ibid*). La planta heterocigótica *sft-4537* mostró los efectos de heterosis más fuertes en el rendimiento total, así como en múltiples rasgos relacionados con el rendimiento, lo que sugiere un efecto pleiotrópico dramático en el crecimiento. Los efectos de la heterosis del mutante heterocigótico *sft-4537* fueron reproducibles en un segundo ambiente experimental en Kefar Masarik, Israel (Tabla 1).

Tabla 1: heterosis de gen único de heterocigoto mutante *SFT* de tomate

UBICACIÓN 1 AKKO						
Genotipo	Peso de la planta (kg)	Peso de la fruta verde (Kg)	Peso de la fruta roja (Kg)	Rendimiento total (Kg)	Peso de fruta única (g)	Número de fruta
M82	3,87 (0,23)	3,56 (0,41)	8,10 (0,57)	11,76 (0,76)	66,3 (1,23)	172,8 (10,46)
<i>sft-4537</i> plantas heterocigóticas	5,77* (0,39)	7,89* (0,71)	14,19* (0,57)	22,10* (1,3)	78,7* (1,85)	280,9* (15,78)
UBICACIÓN 2 KEFAR MASARIK						
Genotipo	Peso de la planta (kg)	Peso de la fruta verde (Kg)	Peso de la fruta roja (Kg)	Rendimiento total (Kg)	Peso de fruta única (g)	Número de fruta
M82	1,96 (0,23)	1,13 (0,31)	10,4 (0,91)	11,53 (0,94)	67,40 (3,1)	173,9 (19,34)
<i>sft-4537</i> plantas heterocigóticas	2,72* (0,23)	1,43 (0,31)	15,51* (0,91)	16,94* (0,94)	72,40 (2,9)	235,5* (18,23)

[0116] En Akko, Israel, los seis rasgos medidos de planta heterocigótica para *SFT* fueron estadísticamente mayores ($p < 0,05$; prueba t de Dunnett) de control de plantas homocigóticas M82 (marcadas con *). En Kefar Masarik, Israel, cuatro de cada seis rasgos, incluido el rendimiento total, fueron estadísticamente más altos ($p < 0,05$) que las plantas M82 homocigóticas de control (*). Los números entre paréntesis representan errores estándar.

[0117] El resultado dramático observado para el mutante individual *SFT* proporcionó apoyo que este gen es responsable de la heterosis, pero otras explicaciones eran posibles (por ejemplo, mutaciones de fondo desconocidas o mutagénesis general inducida por cambios en la regulación). Para obtener evidencia inequívoca de que la heterocigosidad de los alelos mutantes *SFT* causa heterosis, se examinaron tres alelos derivados independientemente de la *SFT* que resultaron de una sustitución, eliminación y un codón de parada en el gen de M82 que se examinaron al año siguiente (2009).

[0118] La mutación *sft-4537* descrita anteriormente es un solo cambio de pares de bases que resulta en un único cambio de aminoácidos de treonina (T) a isoleucina (I). *sft-4537* se representa en la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6, que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 5.

[0119] La mutación *sft-7187* es una delección de dos pares de bases que causa un desplazamiento de marco y un codón de parada aguas abajo que trunca el C-terminal de la proteína *SFT*. *sft-7187* se representa en la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 8, que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEX ID NO: 7. Estas dos mutaciones fueron descritas previamente (Lifschitz, et al, 2006, *ibid*)

[0120] La mutación *sft-parada* es un solo cambio de pares de bases que causa un codón de parada temprana que trunca los últimos dos tercios de la proteína *SFT*. *sft-stop* se representa en la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4, que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEX ID NO: 3.

[0121] Esta mutación se describe en esta solicitud por primera vez, por lo que tanto la secuencia en sí como su falta de función son nuevas.

[0122] Los tres alelos se cruzaron a M82 y las plantas se ensayaron en ensayos replicados en espaciado amplio (1 planta por m²). Como se puede ver en la Figura 4, el rendimiento de fruto de las tres mutaciones homocigóticas fue considerablemente más bajo que el M82, revelando una depresión endogámica, pero todos los híbridos mutantes tuvieron un rendimiento mayor que el M82 que casi igualó al híbrido de tomate comercial líder AB2.

[0123] Otra prueba del efecto ODO mutante es cruzar los mutantes a otro fondo genético y generar híbridos con y sin la variante alelos *SFT*. M82 se cruzó a E6203 (ambas líneas tienen ~40 años) y el híbrido F1 tuvo un rendimiento de azúcar (g por m²) similar al del E6203 consanguíneo. El híbrido de M82 que alberga el alelo mutante con E6203 fue significativamente más alto que el híbrido de control en espaciado amplio y denso (Figura 5B y C) y similar al del híbrido moderno AB2 de alto rendimiento. Se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados) en diferentes antecedentes genéticos, densidad de siembra y condiciones de sequía, destacando así el poder del efecto ODO de la mutación *SFT* en varios antecedentes genéticos.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0124]

ES 2 714 369 T3

<110> Yissum Research Development Company de la Universidad Hebrea de Jerusalén

<120> MUTACIONES RELACIONADAS CON HETEROSIS INDUCIDA

5 <130> YISSUM/070 PCT

<150> 61/103048
<151> 2008-10-06

10 <150> 61/202, 073
<151> 2009-01-27

<160> 8

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 175
<212> PRT

20 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 1

```

25      Met Pro Arg Glu Arg Asp Pro Leu Val Val Gly Arg Val Val Gly Asp
        1              5              10              15

30      Leu Asp Pro Phe Thr Arg Thr Ile Gly Leu Arg Val Ile Tyr Arg Asp
        20              25              30

35      Arg Glu Val Asn Asn Gly Cys Glu Leu Arg Pro Ser Gln Val Ile Asn
        35              40              45

40      Gln Pro Arg Val Glu Val Gly Gly Asp Asp Leu Arg Thr Phe Phe Thr
        50              55              60

45      Leu Met Val Asp Pro Asp Ala Pro Ser Pro Ser Asp Pro Asn Leu Arg
        65              70              75              80

50      Glu Tyr Leu His Trp Leu Val Thr Asp Ile Pro Ala Thr Thr Gly Ser
        85              90              95

55      Ser Phe Gly Gln Glu Ile Val Ser Tyr Glu Ser Pro Arg Pro Ser Met
        100             105             110

60      Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Arg Gln Leu Gly Arg Gln
        115             120             125

65      Thr Val Tyr Ala Pro Gly Trp Arg Gln Asn Phe Asn Thr Arg Asp Phe
        130             135             140

70      Ala Glu Leu Tyr Asn Leu Gly Leu Pro Val Ala Ala Val Tyr Phe Asn
        145             150             155             160

75      Cys Gln Arg Glu Ser Gly Ser Gly Gly Arg Arg Arg Ser Ala Asp
        165             170             175
    
```

<210> 2

ES 2 714 369 T3

<211> 534
 <212> ADN
 <213> Lycopersicon esculentum

5 <400> 2

atgcctagag aacgtgatcc tcttgttggt ggtcgtgtgg taggggatgt attggaccct 60
 10 ttcacaagaa ctattggcct aagagttata tatagagata gagaagttaa taatggatgc 120
 gagccttaggc cttcccaagt tattaaccag ccaaggggtg aagttggagg agatgaccta 180
 15 cgtacctttt tcactttggt tatggtggac cctgatgctc caagtccgag tgatccaaat 240
 ctgagagaat accttactg gttggtcacc gatattccag ctaccacagg ttcaagtttt 300
 20 gggcaagaaa tagtgagcta tgaaagtcca agaccatcaa tgggaataca tcgatttgta 360
 tttgtattat tcagacaatt aggtcggcaa acagtgtatg ctccaggatg gcgtcagaat 420
 ttcaacacaa gagattttgc agaactttat aatcttgggt tacctgttgc tgctgtctat 480
 25 ttttaattgtc aaagagagag tggcagtggt ggacgtagaa gatctgctga ttga 534

<210> 3
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> polipéptido sintético; *SFT* mutante
 35 <400> 3

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

<210> 4
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Polinucleótido sintético; *SFT* mutante
 <400> 4

65

ES 2 714 369 T3

```

atgcctagag aacgtgatcc tcttggtggt ggtcgtgtgg taggggatgt attggaccct      60
5  ttccacaagaa ctattggcct aagagttata tatagagata gagaagttaa taatggatgc      120
gagccttaggc ctteccaagt tattaactag ccaaggggtg aagttggagg agatgacctt      180
cgtaccctttt tcactttggt tatggtggac cctgatgctc caagtccgag tgatccaaat      240
10 ctgagagaaat accttcactg gttggtcacc gatattccag ctaccacagg ttcaagtttt      300
gggcaagaaa tagtgagcta tgaaagtcca agaccatcaa tgggaataca tcgatttgta      360
tttgtattat tcagacaatt aggtcggcaa acagtgtatg ctccaggatg gcgtcagaat      420
15 ttcaacacaa gagattttgc agaactttat aatcttggtt tacctggtgc tgctgtctat      480
tttaattgtc aaagagagag tggcagtggt ggacgtagaa gatctgctga ttga          534

```

```

20 <210> 5
    <211> 175
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
25 <220>
    <223> polipéptido sintético; SFT mutante
    <400> 5

```

```

30 Met Pro Arg Glu Arg Asp Pro Leu Val Val Gly Arg Val Val Gly Asp
    1          5          10          15
35 Leu Asp Pro Phe Thr Arg Thr Ile Gly Leu Arg Val Ile Tyr Arg Asp
    20          25          30
40 Arg Glu Val Asn Asn Gly Cys Glu Leu Arg Pro Ser Gln Val Ile Asn
    35          40          45
45 Gln Pro Arg Val Glu Val Gly Gly Asp Asp Leu Arg Thr Phe Phe Ile
    50          55          60
50 Leu Met Val Asp Pro Asp Ala Pro Ser Pro Ser Asp Pro Asn Leu Arg
    65          70          75          80
55 Glu Tyr Leu His Trp Leu Val Thr Asp Ile Pro Ala Thr Thr Gly Ser
    85          90          95
60
65

```

ES 2 714 369 T3

Ser Phe Gly Gln Glu Ile Val Ser Tyr Glu Ser Pro Arg Pro Ser Met
 100 105 110
 5
 Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Arg Gln Leu Gly Arg Gln
 115 120 125
 10
 Thr Val Tyr Ala Pro Gly Trp Arg Gln Asn Phe Asn Thr Arg Asp Phe
 130 135 140
 15
 Ala Glu Leu Tyr Asn Leu Gly Leu Pro Val Ala Ala Val Tyr Phe Asn
 145 150 155 160
 20
 Cys Gln Arg Glu Ser Gly Ser Gly Gly Arg Arg Arg Ser Ala Asp
 165 170 175

<210> 6
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polinucleótido sintético; *SFT* mutante
 30
 <400> 6

atgcctagag aacgtgatcc tcttggtggt ggtcgtgtgg taggggatgt attggaccct 60
 35
 ttcacaagaa ctattggcct aagagttata tatagagata gagaagttaa taatggatgc 120
 gagcttaggc cttcccaagt tattaaccag ccaagggttg aagttggagg agatgaccta 180
 cgtacctttt tcattttggt tatggtggac cctgatgctc caagtccgag tgatccaaat 240
 40
 ctgagagaat accttcactg gttggtcacc gatattccag ctaccacagg ttcaagtttt 300
 gggcaagaaa tagtgagcta tgaagtcca agaccatcaa tgggaataca tcgatttcta 360
 45
 tttgtattat tcagacaatt aggtcggcaa acagtgtatg ctccaggatg gcgtcagaat 420
 ttcaacacaa gagattttgc agaactttat aatcttggtt tacctggttc tgctgtctat 480
 ttttaattgtc aaagagagag tggcagtggt ggacgtagaa gatctgctga ttga 534

50
 <210> 7
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> polipéptido sintético; *SFT* mutante
 60
 <400> 7

65

ES 2 714 369 T3

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

<210> 8
 <211> 532
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polinucleótido sintético; *SFT* mutante

<400> 8

45	atgcctagag aacgtgatcc tcttggtggt ggtcgtgtgg taggggatgt attggaccct	60
	ttcacaagaa ctattggcct aagagttata tatagagata gagaagtaa taatggatgc	120
50	gagcttaggc cttcccaagt tattaaccag ccaagggttg aagttggagg agatgaccta	180
	cgtacctttt tcactttggt tatggtggac cctgatgctc caagtccgag tgatccaaat	240
	ctgagagaat accttcactg gttggtcacc gatattccag ctaccacagg ttcaagtttt	300
55	gggcaagaaa tagtgagcta taaaagtcca agaccatcaa tgggaatata tgcatttcta	360
	tttgtattat tcagacaatt aggtoggcaa acagtgtatg ctccaggatg gcgtcagaat	420
	ttcaacacaa gagattttgc agaactttat aatcttggtt taacttgetg ctgtctattt	480
60	taattgtcaa agagagagtg gcagtggtgg acgtagaaga totgctgatt ga	532

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una planta de tomate híbrida que comprende una copia del gen *SFT* de tipo salvaje estructuralmente intacta y funcional y una copia *SFT* mutada, en donde el gen *SFT* comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 2 y la mutación en la copia *SFT* es tal que reduce la función del gen *SFT* cuando es homocigótico, y en donde dicha planta híbrida de tomate muestra al menos un fenotipo heterótico relacionado con el rendimiento en comparación con una planta homocigótica que tiene dos copias funcionales de tipo salvaje del gen *SFT*, al menos un fenotipo relacionado con la heterosis es un rendimiento rasgo que afecta al grupo que consiste en la tasa de crecimiento vegetativo, el peso de la planta, el tiempo de floración, el número de inflorescencias, el número de flores por inflorescencia, el tiempo de cuajado de fruta o grano, el peso de grano o fruta, la tolerancia al estrés biótico y la tolerancia al estrés abiótico, dicha planta híbrida de tomate no se obtiene exclusivamente por un proceso esencialmente biológico.

15 2. La planta de tomate híbrida de la reivindicación 1, comprendiendo dicha planta un gen *SFT* de tipo salvaje que tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 2 y un gen *SFT* mutante que tiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8.

20 3. La planta de tomate híbrida de la reivindicación 2, en donde el gen *SFT* mutante comprende una secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO: 4.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

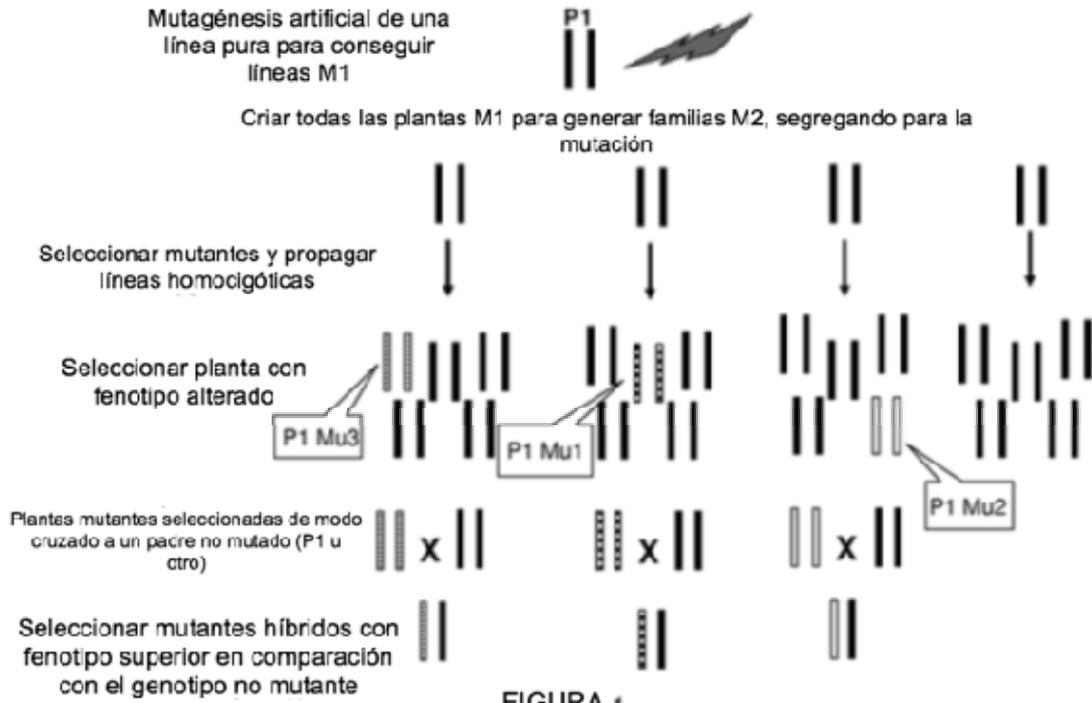


FIGURA 1

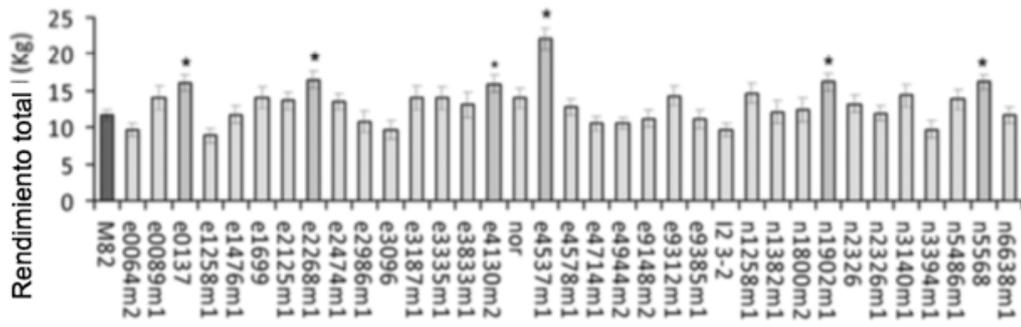


FIGURA 2

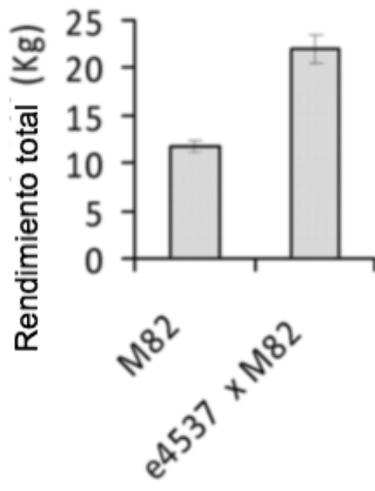


FIGURA 3A

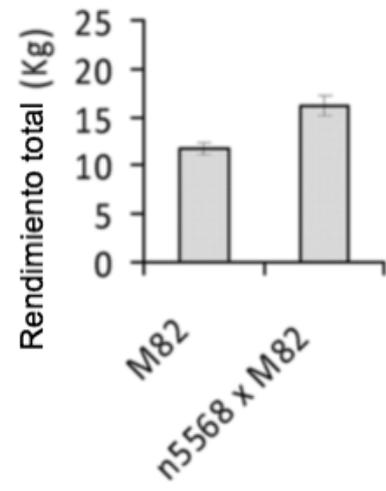


FIGURA 3B

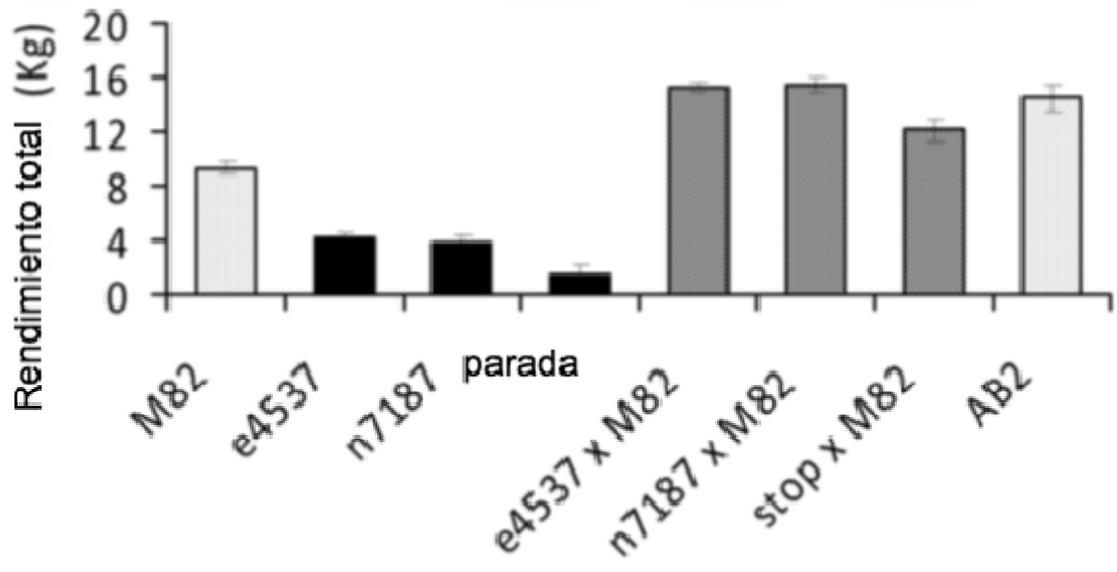


FIGURA 4

FIGURA 5A

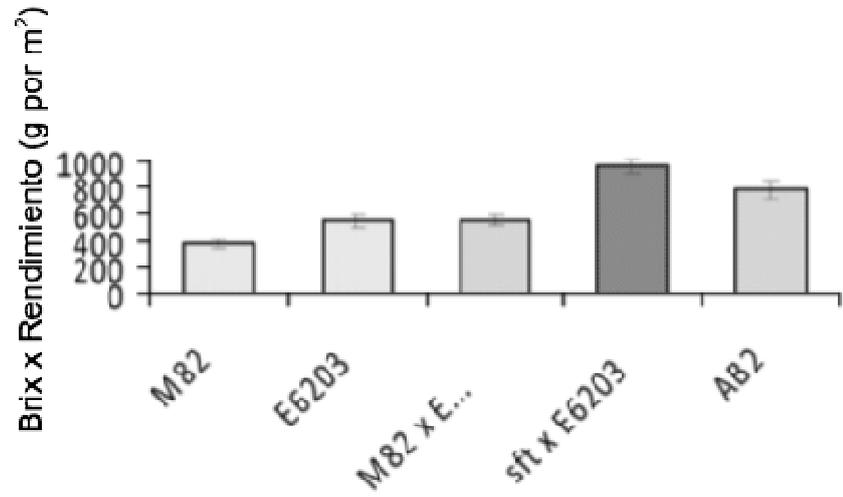


FIGURA 5B

