

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 932**

51 Int. Cl.:

A01H 5/08 (2008.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

A01H 5/00 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2013 PCT/EP2013/062071**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13153237**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2013 E 13728382 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2871936**

54 Título: **Qtl responsable de la firmeza de los frutos del tomate**

30 Prioridad:

12.04.2012 EP 12163971

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

21.10.2019

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)
Rosentalstrasse 67
4058 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**BAXTER, CHARLES;
GRIVET, LAURENT;
BONNET, JULIEN;
CHAPMAN, NATALIE, HELENE y
SEYMOUR, GRAHAM, BARRON**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 727 932 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

Qtl responsable de la firmeza de los frutos del tomate

El tomate es una fuente bien conocida de vitaminas, minerales y antioxidantes, que constituye los componentes esenciales de una dieta saludable equilibrada. También está ampliamente aceptado que los atributos de calidad tales como el color, el aroma y la textura firme influyen fuertemente en la elección del consumidor al adquirir este cultivo caro y fácilmente perecedero.

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. Ralentizar los estados de maduración y ablandamiento permitiría la recolección, transporte y almacenamiento de frutos parcialmente maduros, pero firmes (T. Chanthasombath *et al.*, 2008).

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. Los métodos existentes para potenciar la firmeza de los frutos en programas de fitomejoramiento convencionales dependen del cribado de diferencias en la firmeza del fruto en frutos recolectados de plantas maduras. Cualquier identificación de firmeza de los frutos potenciada en este escenario dependerá en gran medida de la casualidad. Actualmente no es económicamente viable o eficaz el mejoramiento para una firmeza de los frutos potenciada debido al coste y la complejidad del cultivo y fenotipado de grandes cantidades de plantas.

Superar este espacio entre el modelo emergente para la regulación de la maduración de los frutos y un conocimiento completo de los componentes implicados en el control de la firmeza de los frutos requerirá estrategias adicionales a las basadas en abordar genes de proteínas relacionadas con la pared celular conocidos o investigar mutantes de maduración pleiotrópicos. La firmeza de los frutos es un rasgo cuantitativo que implica muchos genes y además la identidad de la mayoría de estos genes sigue siendo esquivada.

Las especies silvestres 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.

Existe claramente la necesidad de selección eficaz y temprana de genotipos que probablemente presenten frutos más firmes cuando están maduros. Sin embargo, el trabajo previo en el área de la textura se ha visto obstaculizado por problemas de reproducibilidad y precisión.

Sumario de la invención

Los autores de la invención han definido un elemento genético (o QTL) que está ligado a una firmeza de los frutos significativamente aumentada en el tomate.

El elemento genético está en el cromosoma 3 del tomate y se ha limitado a una región de 2,1 MB (entre los marcadores de ADN TG599 y TG42). El análisis adicional ha revelado que el elemento genético contiene el gen de la pectato liasa (PL) del tomate. Los resultados del programa de EST de tomate (<http://www.tigr.org/tdb/lgi/index.html>) han sugerido previamente un alto nivel de expresión génica de tipo PL en frutos de tomate maduros. Sin embargo, los autores de la presente invención ha demostrado sorprendentemente que los niveles de expresión del gen PL, cuando se someten a introgresión en tomate cultivado de una fuente de tomate silvestre, es aproximadamente 20 veces inferior que los encontrados en plantas de control. También se ha demostrado que, cuando la región que comprende el gen PL se somete de introgresión, hay un aumento correspondiente en la firmeza de los frutos. Este aumento se observa únicamente después del estado de irrupción. La solicitud actual, por tanto, demuestra por primera vez la importancia de la firmeza de los frutos específica del estado de desarrollo asociada con PL de una fuente silvestre en un fondo cultivado.

La presente divulgación, por lo tanto, se refiere, en un primer aspecto, a un fruto de tomate con firmeza de los frutos significativamente aumentada en el estado de recolección, preferiblemente en el estado de irrupción más 7 días, en el que dicha firmeza de los frutos aumentada está ligada a dichos elementos genéticos en la planta de tomate cultivada que produce dicho fruto de tomate, en el que dicha firmeza es hasta 4 veces mayor o, más preferiblemente, hasta 2 veces mayor que la de un fruto de una planta de tomate de control que no tiene este elemento genético. Las líneas de introgresión IL3-4 (deposítadas con el número de acceso LA3489), y que albergan

este elemento genético, mostraron un aumento significativo en la firmeza de los frutos en comparación con un control precursor M82. Hay un efecto dominante de ese elemento genético en la generación F1 y el rasgo es más evidente en frutos de tomate maduros.

5 También se proporciona una planta de tomate cultivada que produce frutos de tomate con firmeza aumentada como se describe anteriormente, en la que dicha planta puede caracterizarse por a) el al menos un elemento genético está ligado a al menos un marcador de ADN seleccionado del grupo que consiste en TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42 y/o b) el al menos un elemento genético es complementario al elemento genético correspondiente en las líneas de *S. pennellii* IL3-4, en la que dicho elemento genético en IL3-4 está ligado a al menos un marcador de ADN seleccionado de dicho grupo de (a).

10 También se proporciona una planta de tomate cultivada que produce frutos de tomate con firmeza aumentada como se describe anteriormente, en la que dicha planta puede caracterizarse por a) el al menos un elemento genético está ligado a al menos un marcador de ADN seleccionado del grupo que consiste en NT3374FM, TG246 y NT5880VC y/o b) el al menos un elemento genético es complementario al elemento genético correspondiente en las líneas de *S. pennellii* IL3-4, en la que dicho elemento genético en IL3-4 está ligado a al menos un marcador de ADN
15 seleccionado de dicho grupo de (a).

También se proporciona una planta de tomate cultivada, en la que el al menos un elemento genético es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.

20 También se proporciona una planta de tomate cultivada como se describe anteriormente, en la que el QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN NT3374FM, TG246 y NT5880VC; que esté presente únicamente en el pericarpio exterior.

También se proporciona una planta de tomate cultivada como se describe anteriormente, en la que dicha planta es endogámica, diploide o híbrida. En un aspecto específico, la planta tiene esterilidad masculina.

También se proporciona una semilla de tomate que produce una planta de tomate cultivada de la presente divulgación.

25 También se proporciona una parte vegetal de una planta de tomate cultivada como se describe en este documento. En un aspecto específico, se proporciona material vegetal obtenible de una parte vegetal de una planta de tomate cultivada como se describe en este documento.

30 Los marcadores de ADN identificados anteriores representan una herramienta de ensayo e investigación rápida para seleccionar plantas de tomate cultivadas que contienen una región genética definida. Estos marcadores de ADN producen el potencial de manipular una región genética muy pequeña y bien definida que está ligada a firmeza de los frutos aumentada. Esto tiene la ventaja de permitir el cribado de grandes cantidades (miles) de plantas a un estado muy temprano de desarrollo para combinaciones deseables de marcadores de ADN y permitirá la potenciación de la firmeza de los frutos en variedades comerciales de tomate.

35 También se proporciona un método para detectar un QTL ligado a firmeza de los frutos significativamente aumentada en frutos de una planta de tomate cultivada como se describe anteriormente en comparación con una planta de tomate de control, que comprende las etapas de a) cruzar una planta de tomate donadora con una planta de tomate receptora para proporcionar plantas descendientes, b) determinar cuantitativamente la firmeza en el fruto de dichas plantas descendientes, c) establecer un mapa de ligamiento genético que ligue la firmeza de los frutos aumentada observada con la presencia de al menos un marcador de ADN de dicha planta donadora en dichas plantas descendientes y d) asignar a un QTL los marcadores de ADN en dicho mapa que están ligados a firmeza de los frutos significativamente aumentada.
40

Preferiblemente, dicha planta donadora tiene frutos con una firmeza de los frutos significativamente aumentada en comparación con dicha planta receptora.

45 Preferiblemente, la planta donadora es *S. pennellii* y la planta receptora es *S. lycopersicum*. El intervalo de firmeza de los frutos en las plantas descendientes es hasta 4 veces mayor, o como alternativa, hasta 2 veces mayor, que en los frutos producidos a partir de una planta de tomate de control en el estado de recolección. Preferiblemente, el estado de recolección es el estado de irrupción más 7 días. Preferiblemente, el al menos un marcador de ADN se selecciona de TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42. Preferiblemente, dicho QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN NT3374FM, TG246 y NT5880VC.

50 En un aspecto, dicho QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN NT3374FM, TG246 y NT5880VC; que está presente únicamente en el pericarpio exterior.

También se proporciona un QTL responsable de la firmeza de los frutos aumentada en frutos de una planta de tomate cultivada detectado por un método como se describe en este documento.

En un aspecto, dicho QTL está ubicado en el cromosoma 3.

En un aspecto, se proporciona un QTL como se describe en este documento ligado a al menos un marcador de ADN seleccionado del grupo que consiste en TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.

En un aspecto, se proporciona un QTL como se describe en este documento, en el que dicho QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.

- 5 En un aspecto, se proporciona un QTL como se describe en este documento, en el que dicho QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN NT3374FM, TG246 y NT5880VC; que está presente únicamente en el pericarpio exterior.

También se proporciona una muestra de ADN aislada obtenida de una planta de tomate que comprende un QTL como se describe en este documento.

- 10 También se proporciona un método de producción de una planta de tomate que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento.

También se proporciona un método de producción de una planta de tomate cultivada descendiente que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada, que comprende las etapas de realizar un método para detectar un QTL ligado a firmeza de los frutos aumentada, y transferir un ácido nucleico que comprende al menos un QTL así detectado, de una planta de tomate donadora a una planta de tomate receptora, en el que dicha firmeza de los frutos aumentada se mide en los frutos de una planta de tomate cultivada descendiente en comparación con frutos de una planta de tomate de control. La transferencia de ácido nucleico puede realizarse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transformación, fusión de protoplastos, una técnica de haploide duplicado o rescate de embriones.

- 20 Preferiblemente, el intervalo de firmeza de los frutos en la planta de tomate descendiente es mayor que los frutos de una planta de tomate de control en el estado de irrupción más 7 días. El intervalo de firmeza de los frutos podría ser hasta 4 veces mayor o, como alternativa, hasta 3 veces mayor o, como alternativa, hasta 2 veces mayor. Preferiblemente, la planta donadora es *S. pennellii* y la planta receptora es *S. lycopersicum*. Preferiblemente, dicho QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.

- 25 En un aspecto, dicho QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN NT3374FM, TG246 y NT5880VC; que está presente únicamente en el pericarpio exterior.

También se proporciona una planta de tomate, o parte de la misma, obtenible por un método como se describe en este documento.

- 30 También se proporciona una planta de tomate cultivada que comprende un QTL responsable de firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento.

También se proporciona una planta de tomate híbrida, o parte de la misma, obtenible por cruce de una planta de tomate como se describe en este documento con una planta de tomate que muestra características comercialmente deseables.

- 35 También se proporciona una semilla de tomate producida por el cultivo de una planta de tomate como se describe en este documento.

También se proporciona una semilla de tomate producida por cruce de una planta de tomate como se describe en este documento con una planta que tiene rasgos fenotípicos deseables para obtener una planta que tiene firmeza de los frutos significativamente aumentada en comparación con una planta de control.

- 40 También se proporciona el uso de un QTL como se describe en este documento para la producción de una planta de tomate que tiene firmeza de los frutos aumentada en comparación con una planta de control.

También se proporciona el uso de una planta de tomate para expandir la brecha de recolección de los frutos de tomate y/o para su uso en el mercado de productos frescos o para el procesamiento de alimentos.

También se proporciona alimento procesado hecho a partir de una planta de tomate que comprende al menos un QTL como se describe en este documento.

- 45 Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 Mediciones mecánicas en el pericarpio exterior de líneas IL3-4 revela firmeza de los frutos significativamente potenciada en el estado de irrupción más 7 días y el estado de irrupción más 14 días en comparación con los controles M82. El gráfico muestra la carga máxima (N) en el eje de ordenadas y el estado de desarrollo de los frutos en el eje de abscisas.

Fig. 2 Mediciones mecánicas revelan que el efecto de textura de *S. pennellii* parece ser semidominante en individuos heterocigóticos. El gráfico muestra la carga máxima (N) en el eje de ordenadas y las poblaciones precursoras y F1 usadas en el eje de abscisas.

5 Fig. 3 Ubicación de QTL para la firmeza de los frutos aumentada en el cromosoma 3F de tomate determinada midiendo la firmeza de los frutos en el pericarpio exterior. El QTL1 se muestra como una barra sólida negra. Las posiciones de los marcadores y la distancia entre ellos se muestran en el eje de abscisas. La puntuación de LOD se muestra en el eje de ordenadas.

10 Fig. 4 Determinaciones de la media de la firmeza de los frutos en el pericarpio exterior de QTL-NIL seleccionados y líneas precursoras. El eje de ordenadas muestra la carga máxima (N) y el eje de abscisas representa el número de línea.

Fig. 5 Genotipado de líneas seleccionadas aleatoriamente de IL3-4 para mostrar la distribución de eventos de recombinación con respecto a SSR de Syngenta y marcadores de RFLP y basados en PCR publicados. Clave: A = M82; B = *S. pennellii*; * = datos ausentes. Los marcadores de SSR se muestran en la columna a mano izquierda. Las líneas seleccionadas se muestran en la fila superior.

15 Descripción detallada de la invención

Definiciones

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.

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

25 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.

30 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 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.

35 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 incluso un gen que se altera o está controlado por un factor genético que contribuye al fenotipo presentado por dicho QTL.

40 Como se usa en este documento, el término "retrocruzamiento", y variantes gramaticales del mismo, se refiere a un proceso en que un obtentor cruza una descendencia híbrida de nuevo con uno de los precursores, por ejemplo, un híbrido de la primera generación F1 con uno de los genotipos precursores del híbrido F1. En algunas realizaciones, un retrocruzamiento se realiza repetidamente, con un individuo de la descendencia de un retrocruzamiento, estando en sí mismo retrocruzado con el mismo genotipo precursor.

45 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.

50 Para los fines de la presente invención, el término "cosegregación" se refiere al hecho de que el alelo para el rasgo y el alelo o los alelos para los marcadores tienden a transmitirse juntos porque están físicamente muy juntos en el mismo cromosoma (recombinación reducida entre ellos a causa de su proximidad física) que provoca una asociación no aleatoria de sus alelos. La "cosegregación" también se refiere a la presencia de dos o más rasgos dentro de una única planta de los que se sabe que al menos uno es genético y que no puede explicarse fácilmente por casualidad.

Se entiende dentro del alcance de la invención que una "planta de tomate 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 de tomate cultivadas" excluye aquellas especies de tipo silvestre que comprenden el rasgo que es objeto de esta invención como un rasgo natural y/o parte de su genética natural. Las plantas de tomate cultivadas también presentan típicamente resistencia al virus del mosaico del tabaco, mientras que las especies de tipo silvestre no. Para los fines de la presente invención, la línea de introgresión de *S. pennellii* IL3-4 no se considera una línea cultivada, mientras que la línea precursora M82 y las líneas recombinantes, por ejemplo, Q7774, se consideran líneas cultivadas.

Como se usa en este documento, la expresión "línea dihaploide", se refiere a líneas endogámicas estables que han surgido de cultivo de anteras. Algunos granos de polen (haploides) cultivados en medio y circunstancias específicas pueden desarrollar plántulas que contienen n cromosomas. Estas plántulas entonces están "duplicadas" y contienen 2n cromosomas. La descendencia de estas plántulas se llama "dihaploide" y esencialmente ya no son segregantes (estables).

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.

Como se usa en este documento, la expresión "arquitectura genética en el QTL" se refiere a una región genómica que está estadísticamente correlacionada con el rasgo fenotípico de interés y representa la base genética subyacente del rasgo fenotípico de interés.

"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 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 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 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 descendiente 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.

5 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 producen 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.

15 Como se usa en este documento, la expresión "línea endogámica" se refiere a una población genéticamente homocigótica o casi homocigótica. Una línea endogámica, por ejemplo, puede obtenerse mediante varios ciclos de reproducción entre hermanos o de autopolinización o en producción de dihaploides. En algunas realizaciones, las líneas endogámicas reproducen verdaderamente uno o más rasgos fenotípicos de interés. Un "endogámico", "individuo endogámico" o "descendencia endogámica" es un individuo muestreado de una línea endogámica.

20 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 receptora.

25 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 segregar 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).

30 Como se usa en este documento, la expresión "grupo de ligamiento" se refiere a todos los genes o rasgos genéticos que están ubicados en el mismo cromosoma. Dentro de un grupo de ligamiento, aquellos locus que están suficientemente juntos pueden mostrar ligamiento en cruces genéticos. Como la probabilidad de entrecruzamiento aumenta con la distancia física entre locus en un cromosoma, los locus para los que las ubicaciones están alejadas entre sí dentro de un grupo de ligamiento podrían no mostrar ningún ligamiento detectable en ensayos genéticos directos. La expresión "grupos de ligamiento" se usa principalmente para hacer referencia a locus genéticos que muestran comportamiento ligado en sistemas genéticos donde no se han hecho aún asignaciones cromosómicas. Por tanto, en el presente contexto, la expresión "grupo de ligamiento" es sinónima de la entidad física de un cromosoma, aunque un experto en la materia entenderá que un grupo de ligamiento también puede definirse como correspondiente a una región de (es decir, menos que la entidad) de un cromosoma dado. Preferiblemente, los marcadores de la presente invención no están a más de 1 cM del elemento genético que confiere firmeza de los frutos.

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.

45 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.

50 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.

55 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.

5 Se entiende dentro del alcance de la invención que "microsatélite o marcador de SSR (repeticiones de secuencia simples)" se refiere a un tipo de marcador genético que consiste en numerosas repeticiones de secuencias cortas de bases de ADN, que se encuentran en locus por todo el genoma de la planta y tiene una probabilidad de ser altamente polimórfico.

10 "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 fosforamidoato, fosforotioato, fosforditioato 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).

20 Como se usa en este documento, el término planta "descendiente" se refiere a cualquier planta resultante como descendencia de una reproducción vegetativa o sexual de una o más plantas progenitoras o vástagos de las mismas. Por ejemplo, una planta descendiente puede obtenerse clonando o autopolinizando una planta progenitora o cruzando dos plantas progenitoras e incluyen autopolinizaciones, así como las generaciones F1 o F2 o más posteriores. Un F1 es un descendiente de primera generación producido a partir de progenitores de los que al menos uno se usa por primera vez como donador de un rasgo, mientras que un descendiente de segunda generación (F2) o generaciones posteriores (F3, F4, y similares) son ejemplares producidos por autopolinización de F1, F2 y similares. Un F1, por tanto, puede ser (y en algunas realizaciones es) un híbrido resultante de un cruce entre dos progenitores de línea pura (de línea pura es homocigótico para un rasgo), mientras que un F2 puede ser (y en algunas realizaciones es) un descendiente resultante de autopolinización de los híbridos F1.

30 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.

35 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 estado de desarrollo, en particular, una planta seminal.

40 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.

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 estados de desarrollo.

45 "Material vegetal" se refiere a hojas, tallos, raíces, flores o partes de la flor, frutos, polen, óvulos, cigotos, semillas, esquejes, cultivos celulares o tisulares, o cualquier otra parte o producto de una planta.

50 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 una planta 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.

55 "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.

5 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.

10 "Sonda", como se usa en este documento, se refiere a un grupo de átomos o moléculas que puede reconocer y unirse a una molécula diana específica o estructura celular y que permite, por tanto, la detección de la molécula diana o estructura. Particularmente, "sonda" se refiere a una secuencia de ADN o ARN marcada que puede usarse para detectar la presencia de y para cuantificar una secuencia complementaria por hibridación molecular.

15 Como se usa en este documento, el término "descendencia" se refiere al vástago o vástagos 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 vástago o los vástagos pueden ser, por ejemplo, de la generación F1, la generación F2 o cualquier generación posterior.

20 El término "QTL" se usa en este documento en su acepción reconocida en la técnica. La expresión "QTL ligado a firmeza de los frutos aumentada en tomate", así como la expresión más corta "QTL para firmeza de los frutos aumentada" se refiere a una región ubicada en una cromosoma particular de tomate que está ligada a al menos un gen que es responsable de la firmeza de los frutos aumentada o al menos una región reguladora, es decir, una región de un cromosoma que controla la expresión de uno o más genes implicados en la firmeza de los frutos aumentada. Un QTL puede comprender, por ejemplo, uno o más genes, cuyos productos confieren firmeza de los frutos aumentada. Como alternativa, un QTL puede comprender, por ejemplo, genes o secuencias reguladoras, cuyos productos influyen en la expresión de genes en otros locus en el genoma de la planta, confiriendo de este modo la firmeza de los frutos aumentada. Los QTL de la presente invención pueden definirse indicando su ubicación genética en el genoma de la incorporación de tomate silvestre respectiva usando uno o más marcadores genómicos moleculares. Uno o más marcadores, a su vez, indican un locus específico. Las distancias entre los locus se miden habitualmente por la frecuencia de entrecruzamiento entre locus en el mismo cromosoma. Cuanto más alejados estén dos locus, mayor será la probabilidad de que se produzca un entrecruzamiento entre ellos. A la inversa, si dos locus están muy juntos, es muy poco probablemente que se produzca un entrecruzamiento entre ellos. Como norma, un centimorgan (cM) es igual a un 1 % de recombinación entre locus (marcadores). Cuando un QTL puede indicarse por múltiples marcadores, la distancia genética entre los marcadores de punto final es indicativa del tamaño del QTL.

30 Como se usa en este documento, el término "QTL1" se refiere a la región genómica ligada a firmeza de los tomates aumentada como se define por los marcadores TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42. Para los fines de la presente divulgación, se dice que estos marcadores están presentes en el cromosoma 3 de *S. pennellii*.

40 La expresión "determinar cuantitativamente" se define en este documento como establecer o evaluar de una manera que implica medición, en particular la medición de aspectos medibles en términos de cantidades y número. Determinaciones en grados de gravedad e indicaciones mayores de, más, menos o igual magnitud o creciente o decreciente, no están comprendidas en la presente expresión "determinar cuantitativamente", que es una expresión que finalmente implica la presencia de un mecanismo de recuento objetivo para determinar valores absolutos.

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

45 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. Por ejemplo, los QTL de la presente invención se encontraban en ubicaciones específicas en el cromosoma 3 de *S. pennellii*. Como un ejemplo, *S. pennellii* representa el fondo genético natural de QTL1 en el cromosoma 3 de *S. pennellii*. A la inversa, un método que implica la transferencia de ADN que comprende este QTL, o una parte que confiere firmeza de los frutos del mismo, del cromosoma 3 de *S. pennellii* a la misma posición en el cromosoma 3 de otra especie de tomate, preferiblemente *S. lycopersicum* cultivada, producirá este QTL, o dicha parte que confiere firmeza de los frutos del mismo, sin estar en su fondo genético natural.

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

55 "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 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 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 parámetros opcionales se dejan preferiblemente 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 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, pueden usarse 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 emparejamientos incorrectos sin importancia que pueden ajustarse reduciendo la rigurosidad del medio de hibridación para alcanzar la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana.

Como se usa en este documento, la expresiones "cruce sexual" y "reproducción sexual", en el contexto del asunto divulgado en la presente, se refiere a la fusión de gametos para producir descendencia (por ejemplo, por fertilización, tal como para producir semillas por polinización en plantas). Un "cruce sexual" o "fertilización cruzada" es, en algunas realizaciones, fertilización de un individuo con otro (por ejemplo, polinización cruzada en plantas). El término "autopolinización" se refiere, en algunas realizaciones, a la producción de semillas por autofertilización o autotransferencia de polen, es decir, el polen y el óvulo son de la misma planta.

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 firmeza de los frutos deseada, que es convencional. Las condiciones de crecimiento pueden ser, por ejemplo, un fotoperiodo de 16 h (flujo de fotones fotosintéticos (PPF) de 50 a 1000 $\mu\text{mol nv}^{-2} \text{s}^{-1}$), 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 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 rigurosidad baja 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" significa cualquier planta, línea o población dentro de la especie *Solanum lycopersicum* (son sinónimos *Lycopersicon lycopersicum* o *Lycopersicon esculentum*) o antiguamente conocido con el nombre del género de *Lycopersicon* incluyendo, aunque sin limitación, *L. cerasiforme*, *L. cheesmanii*, *L. chilense*, *L. chmielewskii*, *L. esculentum* (ahora *S. pennellii*), *L. hirsutum*, *L. parviborum*, *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, firmeza de los frutos aumentada. Un rasgo puede heredarse de una manera dominante o recesiva, o puede ser monogénico o poligénico.

Se entiende dentro del alcance de la invención que "monogénico" se refiere a que se determina mediante un único locus.

Se entiende dentro del alcance de la invención que "poligénico" se refiere a que se determina mediante más de un locus.

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 "estado de recolección" significa la fecha de recolección, es decir, la fecha en que se retira el fruto de tomate de la planta.

"Estado verde inmaduro" 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.

"Estado verde maduro" 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 almacenamiento, transporte y en el estante del supermercado; sin embargo, de alguna manera carecen de aroma y sabor completo.

"Estado de irrupción" 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" 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.

- 5 Se entiende dentro del alcance de la invención que "elemento genético" y "elemento genético o parte del mismo" significan un QTL o parte del mismo (en particular, un gen que reside en el cromosoma bajo el QTL) 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.
- 10 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.
- 15 Se entiende dentro del alcance de la invención que "características comercialmente deseables" incluyen, aunque sin limitación, calidad de los frutos superior, resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, forma y tamaño uniformes.
- 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 venta comercial. Típicamente, la brecha de recolección empieza en el estado verde maduro y continúa hasta el estado de irrupción más dos a cinco días, dependiendo de la variedad de cultivo y las condiciones ambientales.
- 20 Se entiende dentro del alcance de la invención que "planta de tomate donadora" significa la planta de tomate que proporciona al menos un elemento genético ligado a la firmeza de los frutos significativamente aumentada.
- 25 Se entiende 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 ligada genéticamente al elemento genético responsable de la firmeza de los frutos aumentada y en la que 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.
- 30 Se entiende dentro del alcance de la divulgación que "partes de QTL que confieren firmeza de los frutos" significa el o los elementos genéticos o parte o partes de los mismos responsables de la firmeza de los frutos del tomate aumentada determinada por mediciones mecánicas como se describe en los ejemplos.
- 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 que tienen un valor de carga máxima aumentado (por ejemplo, como se describe en el ejemplo 1), estadísticamente significativo a $P < 0,05$ o $P < 0,01$ en comparación con frutos de una planta de control.
- 35 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.
- 40 Se entiende dentro del alcance de la invención que "planta de tomate de control" significa una planta de tomate que tiene el mismo fondo genético que la planta de tomate cultivada de la presente invención, en la que la planta de control no tiene nada del al menos un elemento genético, o parte del mismo, de la presente invención ligado a la firmeza de los frutos aumentada. En particular una planta de tomate de control es una planta de tomate que pertenece a la misma variedad de planta y no comprende nada del al menos un elemento genético, o parte del mismo. La planta de tomate de control se cultivar durante el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones que la planta de tomate cultivada de la presente invención. La variedad de planta en este documento se entiende de acuerdo con la definición de UPOV. Por tanto, una planta de tomate de control puede ser una línea endogámica o un híbrido, con la condición de que tenga el mismo fondo genético que la planta de tomate de la presente invención, excepto que la planta de control no tiene nada del al menos un elemento genético, o parte del mismo, de la presente invención ligado a la firmeza de los frutos aumentada.
- 45 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.
- 50 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.
- Se entiende dentro del alcance de la invención que "mercado de productos frescos" significa hortalizas en el mercado que se han procesado mínimamente.

Se entiende dentro del alcance de la invención que "primera hoja verdadera" significa cuando surge la primera hoja después del brote de las hojas seminales o los cotiledones.

Fitomejoramiento

5 El fin de los programas de mejoramiento en agricultura y horticultura es potenciar el rendimiento de las plantas mejorando su composición genética. En esencia, esta mejora se produce aumentando la frecuencia de los alelos más favorables para los genes que influyen en las características de rendimiento de interés.

10 Las líneas de plantas silvestres proporcionan un recurso rico de variación genética y fenotípica. Tradicionalmente, la práctica agrícola u hortícola hace uso de esta variación seleccionando una línea de plantas silvestres o sus descendientes que tiene propiedades genotípicas deseadas o fenotípicas potenciales, cruzándola con una línea que tiene propiedades genotípicas deseadas o fenotípicas potenciales adicionales y seleccionando entre las plantas descendientes aquellas que muestran las propiedades genotípicas deseadas o fenotípicas potenciales (o una frecuencia aumentada de las mismas).

15 Una comprensión creciente y la utilización de las leyes de herencia mendeliana en combinación con herramientas de genética molecular en el pasado siglo han facilitado este proceso de selección. Por ejemplo, han llegado a estar disponibles métodos para seleccionar plantas que tengan propiedades genotípicas deseadas o fenotípicas potenciales basándose en el ensayo de la planta para la presencia de un locus de rasgo cuantitativo (QTL); es decir, para la presencia de un elemento genético que contenga alelos ligados a la expresión de un rasgo fenotípico distribuido de forma continua (cuantitativo). Habitualmente un QTL se caracteriza por uno o más marcadores que están asociados estadísticamente con la variación cuantitativa en el rasgo fenotípico y es esencialmente sinónimo a un gen. El cartografiado de QTL permite la identificación de uno o más elementos genéticos que afectan a la expresión de un rasgo de interés. En el fitomejoramiento, permite la selección asistida por marcador (MAS); es decir, la selección de plantas que tienen alelos favorables detectando en esas plantas los marcadores asociados a QTL.

25 El conocimiento de la herencia de diversos rasgos permitiría la selección de líneas homocigóticas para un QTL ligado a firmeza de los frutos aumentada. El uso del conocimiento del origen genético y la ubicación de un rasgo deseado en un programa de mejoramiento puede aumentar la precisión del resultado de mejoramiento predicho y puede potenciar la tasa de selección en comparación con programas de mejoramiento convencionales. Por ejemplo, el hecho de que la base genética de un rasgo deseado esté hereditariamente ligado a otro rasgo puede ayudar a aumentar la uniformidad de estos dos rasgos entre los descendientes, ya que un precursor homocigótico para los alelos deseados los pasará a la mayoría, si no a todos los descendientes, produciendo una segregación reducida en los descendientes.

30 El asunto divulgado en la presente proporciona mejores modelos para selección asistida por marcador (MAS). El asunto divulgado en la presente se refiere a métodos para el fitomejoramiento y a métodos para seleccionar plantas de tomate, particularmente plantas de tomate cultivadas como plantas de obtentor para su uso en programas de mejoramiento o plantas de tomate cultivadas que tienen propiedades genotípicas deseadas o fenotípicas potenciales, en particular las que producen frutos de tomate con firmeza de los frutos aumentada en el estado de recolección.

40 Por consiguiente, se proporciona un fruto de tomate con firmeza de los frutos significativamente aumentada en el estado de recolección, ligada a un elemento genético en la planta de tomate cultivada que produce dicho fruto de tomate, en el que dicha firmeza es hasta 4 veces mayor que la de un fruto de una planta de tomate de control que no tiene dicho elemento genético.

45 El estado de recolección es preferiblemente el estado de irrupción más 7 días. Como alternativa, el estado de recolección puede ser cualquier punto elegido en el desarrollo del fruto de tomate, que incluye, aunque sin limitación, el estado verde inmaduro, estado de expansión rápida, estado verde maduro, estado de irrupción o estado de maduración rojo o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días después de cualquiera de estos estados. En un aspecto, el estado de recolección es el estado de irrupción más 14 días.

50 En un aspecto específico, se proporciona un fruto de tomate que proporciona firmeza de los frutos aumentada en el estado verde maduro, ligada a un elemento genético en la planta de tomate cultivada que produce dicho fruto de tomate, en el que dicha firmeza es hasta 4 veces mayor que la de un fruto de una planta de tomate de control que no tiene dicho elemento genético. En otro aspecto, dicha firmeza es hasta 2 veces mayor que la de un fruto de una planta de tomate de control que no tiene dicho elemento genético.

55 En un aspecto específico, se proporciona un fruto de tomate que proporciona firmeza de los frutos aumentada en el estado de irrupción más 7 días, causada por un elemento genético en la planta de tomate cultivada que produce dicho tomate, en el que dicha firmeza es hasta 4 veces mayor que la de un fruto de una planta de tomate de control que no tiene dicho al menos un elemento genético. En otro aspecto, dicha firmeza es hasta 2 veces mayor que la de un fruto de una planta de tomate de control que no tiene dicho al menos un elemento genético.

- La firmeza de los frutos se mide preferiblemente en el pericarpio exterior y el pericarpio interior de la planta de tomate cultivada. Como alternativa, la firmeza de los frutos puede medirse en el pericarpio exterior únicamente. Preferiblemente, la firmeza de los frutos se mide por medios mecánicos. Típicamente, se usa una máquina Lloyd LRX como se describe en la sección de ejemplos. Dichas mediciones representan una medida mecánica sensible de firmeza de los frutos que se correlaciona muy bien con ensayos penetrométricos convencionales, pero da resultados sustancialmente más sensibles y reproducibles. Además, estas mediciones también se correlacionan bien con descripciones organolépticas/sensitivas de firmeza de los frutos (King *et al.*, 2001). Sin embargo, también pueden emplearse métodos alternativos para medir la firmeza de los frutos que son conocidos para los expertos, tales como los descritos en Causse *et al.* (2002).
- Preferiblemente, la planta de tomate de control es M82 con número de depósito NCIMB 41661.
- Como alternativa, la planta de control puede ser cualquier planta de tomate que difiera de su descendiente esencialmente debido a la ausencia de al menos un elemento genético, o parte del mismo, responsable de la firmeza de los frutos aumentada en la planta de tomate cultivada. La planta de tomate de control puede seleccionarse de cualquier planta, línea o población dentro de la especie *Solanum lycopersicum* (son sinónimos *Lycopersicon lycopersicum* o *Lycopersicon esculentum*) o antiguamente conocido con el nombre del género de *Lycopersicon* incluyendo, aunque sin limitación, *L. cerasiforme*, *L. cheesmanii*, *L. chilense*, *L. chmielewskii*, *L. esculentum* (ahora *S. pennellii*), *L. hirsutum*, *L. parviborum*, *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)).
- Preferiblemente, el o los elementos genéticos responsables de la firmeza de los frutos significativamente aumentada de la presente divulgación están presentes en el cromosoma 3 del tomate. Preferiblemente, el elemento genético está presente en el cromosoma 3 de *S. pennellii*.
- En un aspecto adicional, se proporciona una planta de tomate cultivada que produce frutos de tomate como se describe en este documento, en la que dicha planta comprende un elemento genético que se caracteriza por al menos un marcador de ADN seleccionado del grupo que consiste en TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.
- En un aspecto adicional, se proporciona una planta de tomate cultivada que produce frutos de tomate, en la que dicha planta comprende un elemento genético que es complementario al elemento genético correspondiente en líneas de *S. pennellii* IL3-4 depositadas con el número de acceso LA3489, en la que dicho elemento genético en *S. pennellii* IL3-4 puede caracterizarse por al menos un marcador de ADN seleccionado del grupo que consiste en TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.
- También se proporciona una planta de tomate cultivada que produce frutos de tomate con firmeza de los frutos aumentada en comparación con frutos de una planta de tomate de control, en la que dicha planta de tomate cultivada tiene un elemento genético que es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.
- También se proporciona una planta de tomate cultivada que produce frutos de tomate con firmeza de los frutos aumentada en comparación con frutos de una planta de tomate de control, en la que dicha planta de tomate cultivada comprende un elemento genético, en la que el elemento genético es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.
- También se proporciona una planta de tomate cultivada que produce frutos de tomate con firmeza de los frutos aumentada en comparación con una planta de tomate de control, en la que dicha planta de tomate cultivada comprende un elemento genético QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.
- También se proporciona una planta de tomate cultivada que produce frutos de tomate con firmeza de los frutos aumentada en comparación con una planta de tomate de control, en la que dicha planta de tomate cultivada comprende un elemento genético, en la que el elemento genético es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN NT3374FM, TG246 y NT5880VC; que está presente únicamente en el pericarpio exterior.
- En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona una planta de tomate cultivada como se describe en este documento, en la que dicha planta es endogámica, dihaploide o híbrida. En un aspecto específico, la planta de tomate cultivada tiene esterilidad masculina.
- En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona semilla de tomate que produce una planta de tomate cultivada como se describe en este documento.

En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona una parte vegetal de una planta de tomate cultivada como se describe en este documento.

En un aspecto adicional, se proporciona material vegetal obtenible de una parte vegetal de una planta de tomate cultivada como se describe en este documento.

5 Identificación de qtl ligados a firmeza de los frutos aumentada en tomate

El asunto divulgado en la presente también proporciona métodos para seleccionar una planta de tomate cultivada con frutos que tienen firmeza aumentada en comparación con frutos de una planta de tomate de control. Dichos métodos comprenden detectar en la planta de tomate cultivada la presencia de QTL1 como se define en este documento. En general, los métodos comprenden proporcionar una muestra de ADN genómico de una planta de tomate; y (b) detectar en la muestra de ADN genómico al menos un marcador molecular ligado a QTL1. En algunas realizaciones, la etapa de detección puede comprender la detección de un marcador molecular del grupo, detectando el al menos un marcador molecular QTL1. Proporcionar una muestra de ADN genómico de una planta de tomate puede realizarse por métodos convencionales de aislamiento de ADN bien conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, la detección de un marcador molecular (etapa (b)) puede comprender el uso de una sonda de ácido nucleico que tiene una secuencia de bases que es sustancialmente complementaria a la secuencia de ácido nucleico que define el marcador molecular y dicha sonda de ácido nucleico hibrida específicamente en condiciones rigurosas con una secuencia de ácido nucleico que define el marcador molecular. Una sonda de ácido nucleico adecuada puede ser, por ejemplo, una hebra individual del producto de amplificación correspondiente al marcador. La detección de un marcador molecular puede comprender también realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico en el ADN genómico para detectar uno o más QTL. Esto puede hacerse realizando una reacción de PCR usando un conjunto de cebadores específicos de marcador. En algunas realizaciones, la detección puede comprender el uso de al menos un conjunto de cebadores que definen uno o más marcadores ligados a QTL1, o un conjunto de cebadores que hibridan específicamente en condiciones rigurosas con secuencias de ácido nucleico de uno o más marcadores ligados a QTL1.

Los métodos divulgados en la presente pueden incluir también detectar un fragmento de ADN amplificado ligado a la presencia de un QTL. En algunas realizaciones, el fragmento amplificado ligado a la presencia de un QTL tiene una longitud o secuencia de ácido nucleico predicha, y la detección de un fragmento de ADN amplificado que tiene la longitud predicha o la secuencia de ácido nucleico predicha se realiza de modo que el fragmento de ADN amplificado tenga una longitud que corresponde (más o menos unas pocas bases; por ejemplo, una longitud de una, dos o tres bases más o menos) a la longitud esperada basándose en una reacción similar con los mismos cebadores con el ADN de la planta en que el marcador se detectó en primer lugar o la secuencia de ácido nucleico que corresponde (tiene una homología, en algunas realizaciones, de más de un 80 %, en algunas realizaciones más de un 90 %, en algunas realizaciones más de un 95 %, en algunas realizaciones más de un 97 % y en algunas realizaciones más de un 99 %) a la secuencia esperada basándose en la secuencia del marcador ligado a ese QTL en la planta en que el marcador se detectó en primer lugar. Un experto en la materia apreciaría que los marcadores que están ausentes en plantas que proporcionan frutos con firmeza de los frutos aumentada, aunque estuvieran presentes en el progenitor o progenitores de control (los llamados transmarcadores), también pueden ser útiles en ensayos para detectar la firmeza de los frutos aumentada entre las plantas descendientes, aunque el ensayo de la ausencia de un marcador para detectar la presencia de un rasgo específico no es óptimo. La detección de un fragmento de ADN amplificado que tiene la longitud predicha o la secuencia de ácido nucleico predicha, puede realizarse por cualquiera de varias técnicas incluyendo, aunque sin limitación, técnicas convencionales de electroforesis en gel o usando secuenciadores automatizados de ADN. Estos métodos son bien conocidos para los expertos.

Marcadores moleculares y qtl

Se usan marcadores moleculares para la visualización de diferencias en secuencias de ácido nucleico. Esta visualización puede deberse a técnicas de hibridación de ADN-ADN después de digestión con una enzima de restricción (RFLP) y/o debido a técnicas usando la reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, STS, SSR/microsatélites, AFLP y similares). En algunas realizaciones, todas las diferencias entre dos genotipos precursores segregan en una población de cartografiado basándose en el cruce de estos genotipos precursores. La segregación de los diferentes marcadores puede compararse y pueden calcularse las frecuencias de recombinación. Se divulgan métodos para cartografiar marcadores en plantas en, por ejemplo, Glick y Thompson, 1993; Zietkiewicz *et al.*, 1994.

Las frecuencias de recombinación de marcadores moleculares en diferentes cromosomas en general son de un 50 %. Entre marcadores moleculares ubicados en el mismo cromosoma, la frecuencia de recombinación en general depende de la distancia entre los marcadores. Una baja frecuencia de recombinación corresponde a una baja distancia genética entre marcadores en un cromosoma. Comparar todas las frecuencias de recombinación produce el orden más lógico de los marcadores moleculares en los cromosomas. Este orden más lógico puede representarse en un mapa de ligamiento (Paterson, 1996). Un grupo de marcadores adyacentes o contiguos en el mapa de

ligamiento que esté ligado a un nivel aumentado de firmeza de los frutos puede proporcionar la posición de un QTL ligado a firmeza de los frutos aumentada.

Los marcadores identificados en este documento pueden usarse en diversos aspectos del asunto divulgado en la presente. Los aspectos del asunto divulgado en la presente no tienen que limitarse al uso de los marcadores identificados en este documento, sin embargo. Se destaca que los aspectos también pueden hacer uso de marcadores no divulgados explícitamente en este documento o incluso por identificar aún. Diferente a la unidad genética "gen", en la que la expresión fenotípica depende de una gran cantidad de factores que no puede predecirse, la unidad genética "QTL" se refiere a una región en el genoma que está directamente relacionada con un rasgo cuantificable fenotípico.

El QTL1 identificado en este documento está ubicado en el cromosoma 3 de tomate y su ubicación puede caracterizarse por varios marcadores por lo demás arbitrarios. En las presentes investigaciones, se usaron marcadores de microsatélites (por ejemplo, SSR) y polimorfismos mononucleotídicos (SNP), aunque también podrían haberse usado marcadores de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), marcadores de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), marcadores de mutaciones de inserción, marcadores de regiones amplificadas caracterizadas por secuencia (SCAR), marcadores de secuencias polimórficas amplificada escindidas (CAPS) o marcadores de isozimas o combinaciones de estos marcadores.

En general, un QTL puede abarcar una región de varios millones de bases. Por lo tanto, proporcionar la información de secuencia completa para el QTL es prácticamente irrealizable, pero también innecesario, ya que la manera en que se detecta el QTL en primer lugar, mediante la correlación observada entre la presencia de una cadena de marcadores genómicos contiguos y la presencia de un rasgo fenotípico particular, permite rastrear entre una población de plantas descendientes aquellas plantas que tengan el potencial genético de mostrar un rasgo fenotípico particular. Proporcionando una lista no limitante de marcadores, el asunto divulgado en la presente, por tanto, proporciona el uso eficaz del QTL divulgado en la presente en un programa de mejoramiento.

En general, un marcador es específico para una línea particular de vástagos. Por tanto, un rasgo específico puede estar ligado a un marcador particular. Los marcadores como se divulga en este documento, no solamente indican la ubicación del QTL, también se correlacionan con la presencia del rasgo genotípico específico en una planta. Se aprecia que los marcadores genómicos contiguos que indican la ubicación del QTL en el genoma son en principio arbitrarios o no limitantes. En general, la ubicación de un QTL se indica por una cadena contigua de marcadores que muestran correlación estadística con el rasgo fenotípico. Una vez que un marcador se encuentra fuera de la cadena (es decir, uno que tiene una puntuación de LOD por debajo de un determinado umbral, lo que indica que el marcador está tan apartado que la recombinación en la región entre ese marcador y el QTL se produce tan frecuentemente que la presencia del marcador no se correlaciona de una manera estadísticamente significativa con la presencia del fenotipo), los límites del QTL pueden considerarse establecidos. Por tanto, también es posible indicar la ubicación del QTL mediante otros marcadores ubicados dentro de esa región especificada. Se aprecia además que los marcadores genómicos contiguos también pueden usarse para indicar la presencia del QTL (y, por tanto, del fenotipo) en una parte individual, que a veces significa que pueden usarse en procedimientos de selección asistida por marcador (MAS). En principio, el número de marcadores potencialmente útiles es limitado, pero puede ser muy grande, y un experto en la materia puede identificar fácilmente marcadores además de los divulgados específicamente en la presente solicitud. Un marcador que está ligado al QTL (por ejemplo, que entra dentro de los límites físicos de la región genómica abarcada por los marcadores que tienen puntuaciones de LOD establecidas por encima de un determinado umbral, indicando de ese modo que se produce ninguna o muy poca recombinación entre el marcador y el QTL en los cruces, así como cualquier marcador en desequilibrio de ligamiento con el QTL, así como marcadores que representan las mutaciones causales reales dentro del QTL) puede usarse en procedimientos de MAS. Esto significa que los marcadores identificados en la solicitud como ligados con QTL1 (marcadores TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42), son meros ejemplos de marcadores adecuados para su uso en procedimientos de MAS. Además, cuando el QTL, o la parte que confiere el rasgo específico del mismo, se somete a introgresión en otro fondo genético (es decir, en el genoma de otra especie de tomate o de planta), entonces algunos marcadores podrían no encontrarse más en los descendientes, aunque el rasgo esté presente en los mismos, lo que indica que dichos marcadores están fuera de la región genómica que representa la parte que confiere el rasgo específico del QTL en la línea precursora original únicamente y que el nuevo fondo genético tiene una organización genómica diferente. Dichos marcadores cuya ausencia indica la introducción satisfactoria del elemento genético en los descendientes se llaman "transmarcadores" (véase anteriormente).

Tras la identificación de un QTL, el efecto del QTL (es decir, la firmeza de los frutos aumentada) puede confirmarse, por ejemplo, evaluando la firmeza de los frutos en la segregación de la descendencia para el QTL en investigación. La evaluación de la firmeza de los frutos puede realizarse adecuadamente midiendo la firmeza de los frutos como se sabe en la técnica.

Los marcadores proporcionados por el asunto divulgado en la presente pueden usarse para detectar la presencia de uno o más alelos de firmeza de los frutos aumentada en los QTL del asunto divulgado en la presente en una planta de tomate con firmeza de los frutos aumentada y, por lo tanto, pueden usarse en métodos que implican mejoramiento asistido por marcador y selección de plantas de tomate con firmeza de los frutos aumentada. En

algunas realizaciones, la detección de la presencia de un QTL del asunto divulgado en la presente se realiza con al menos uno de los marcadores para un QTL como se define en este documento. El asunto divulgado en la presente, por lo tanto, se refiere en otro aspecto a un método para detectar la presencia de un QTL para la firmeza de los frutos aumentada, que comprende detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico del QTL en una planta de tomate, cuya presencia puede detectarse mediante el uso de los marcadores divulgados en este documento.

La secuencia de nucleótidos de un QTL del asunto divulgado en la presente puede resolverse, por ejemplo, determinando la secuencia de nucleótidos de uno o más marcadores ligados al QTL y diseñando cebadores internos para la secuencias marcadoras que pueden usarse entonces para determinar adicionalmente la secuencia del QTL fuera de las secuencias marcadoras. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de los marcadores SSR divulgados en este documento puede obtenerse aislando los marcadores del gel de electroforesis usado en la determinación de la presencia de los marcadores en el genoma de una planta en cuestión, y determinando la secuencia de nucleótidos de los marcadores por, por ejemplo, métodos de secuenciación de terminación de cadena con dideoxi, que son bien conocidos en la técnica. En realizaciones de dichos métodos para detectar la presencia de un QTL en una planta de tomate, el método puede comprender también proporcionar un oligonucleótido o polinucleótido que puede hibridar en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia de ácido nucleico de un marcador ligado al QTL, en algunas realizaciones seleccionado de los marcadores divulgados en este documento, poner en contacto el oligonucleótido o polinucleótido con ácido nucleico genómico digerido de una planta de tomate, y determinar la presencia de hibridación específica del oligonucleótido o polinucleótido del ácido nucleico genómico digerido.

En algunas realizaciones, el método se realiza en una muestra de ácido nucleico obtenida de la planta de tomate, aunque también pueden emplearse métodos de hibridación *in situ*. Como alternativa, un experto en la materia puede diseñar, una vez se ha determinado la secuencia de nucleótidos del QTL, sondas de hibridación específicas u oligonucleótidos que puedan hibridar en condiciones de hibridación rigurosas con la secuencia de ácido nucleico del QTL y puede usar dichas sondas de hibridación en métodos para detectar la presencia de un QTL divulgado en este documento en una planta de tomate.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para detectar un QTL ligado a firmeza de los frutos significativamente aumentada en frutos de una planta de tomate cultivada en comparación con una planta de tomate de control, que comprende las etapas de a) cruzar una planta de tomate donadora con una planta de tomate receptora para proporcionar plantas descendientes, b) determinar cuantitativamente la firmeza de los frutos en el fruto de dichas plantas descendientes, c) establecer un mapa de ligamiento genético que ligue la firmeza de los frutos aumentada observada con la presencia de al menos un marcador de ADN de dicha planta donadora en dichas plantas descendientes y d) asignar a un QTL los marcadores de ADN en dicho mapa que están ligados a firmeza de los frutos significativamente aumentada.

En una realización específica, la planta de tomate donadora tiene frutos con una firmeza de los frutos significativamente aumentada en comparación con dicha planta de tomate receptora.

La planta donadora es preferiblemente *S. pennellii* y la planta receptora es preferiblemente *S. lycopersicum*.

La planta donadora o la planta receptora podría ser una cualquiera de las siguientes: cualquier planta, línea o población dentro de la especie *Solanum lycopersicum* (son sinónimos *Lycopersicon lycopersicum* o *Lycopersicon esculentum*) o antiguamente conocido con el nombre del género de *Lycopersicon* incluyendo, aunque sin limitación, *L. cerasiforme*, *L. cheesmanii*, *L. chilense*, *L. chmielewskii*, *L. esculentum* (ahora *S. pennellii*), *L. hirsutum*, *L. parviborum*, *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)).

En una realización específica, el intervalo de firmeza de los frutos en las plantas descendientes es hasta 4 veces mayor que el de los frutos producidos a partir de una planta de tomate de control en el estado de recolección.

En una realización específica, el intervalo de firmeza de los frutos en las plantas descendientes es hasta 2 veces mayor que el de los frutos producidos a partir de una planta de tomate de control en el estado de recolección.

El estado de recolección es preferiblemente el estado de irrupción más 7 días. Como alternativa, el estado de recolección puede ser cualquier punto elegido en el desarrollo del fruto de tomate, que incluye, aunque sin limitación, el estado verde inmaduro, estado de expansión rápida, estado verde maduro, estado de irrupción, estado de maduración rojo o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días después de cualquiera de estos estados, preferiblemente 10 días después del estado de irrupción.

En una realización específica, el al menos un marcador de ADN se encuentra en *S. pennellii*. Como alternativa, el al menos un marcador de ADN podría encontrarse en cualquier planta, línea o población de tomate.

También se proporciona al menos un marcador de ADN seleccionado de TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.

Un QTL de la presente invención es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.

- 5 En una realización específica, el QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN NT3374FM, TG246 y NT5880VC; que está presente únicamente en el pericarpio exterior.

10 En un aspecto adicional, se proporciona un QTL ligado a firmeza de los frutos aumentada en frutos proporcionados por una planta de tomate cultivada. Preferiblemente, el QTL se detecta por un método como se describe en este documento. Como alternativa, el QTL puede detectarse por cualquier método conocido para los expertos en la materia.

Preferiblemente, el QTL de la presente invención está presente en el cromosoma 3 de *S. pennellii*. Más preferiblemente, el QTL está presente en el cromosoma 3F de *S. pennellii*.

En una realización específica, el QTL de la presente invención está ligado a al menos un marcador de ADN seleccionado del grupo que consiste en NT3374FM, TG246 y NT5880VC.

- 15 El QTL de la presente invención es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.

En una realización específica, el QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN NT3374FM, TG246 y NT5880VC; que está presente únicamente en el pericarpio exterior.

- 20 Se proporciona además una muestra de ADN aislada obtenida de una planta de tomate que comprende QTL1. La muestra de ADN puede aislarse como se describe en los ejemplos o por cualquier otro medio habitual para los expertos en la materia.

Producción de fruto de tomate con firmeza aumentada por métodos transgénicos

25 De acuerdo con otro aspecto del asunto divulgado en la presente, una secuencia de ácido nucleico (en algunas realizaciones un ADN) que comprende QTL1 o partes que confieren firmeza de los frutos del mismo, puede usarse para la producción de una planta de tomate que proporciona frutos con firmeza aumentada en comparación con una planta de tomate de control. En este aspecto, el asunto divulgado en la presente proporciona el uso de un QTL como se define en este documento o partes que confieren firmeza de los frutos aumentada del mismo, para producir una planta de tomate que proporciona frutos con firmeza aumentada en comparación con una planta de tomate de control, cuyo uso implica la introducción de una secuencia de ácido nucleico que comprende el QTL en una planta receptora adecuada. Como se establece, la secuencia de ácido nucleico puede obtenerse de una planta donadora adecuada con firmeza de los frutos aumentada en comparación con una planta de tomate de control. Una fuente adecuada para el locus de firmeza de los frutos aumentada identificado en este documento como QTL1 es *S. pennellii*. Varias variedades de cultivo de tomate que tienen grados variables de firmeza de los frutos aumentada están disponibles en el mercado.

35 La fuente de los locus de firmeza de los frutos aumentada descritos en este documento son líneas de introgresión IL-3, que se generaron originalmente por Dani Zamir y colaboradores (Eshed y Zamir, 1994). Esta línea se obtuvo del Tomato Genetics Resource Centre en Davis, California (<http://tgrc.ucdavis.edu/>) o de Dani Zamir en la Universidad Hebrea de Jerusalén, Israel. Una vez identificada en una planta donadora adecuada, la secuencia de ácido nucleico que comprende un QTL para firmeza de los frutos aumentada, o parte que confiere firmeza de los frutos aumentada del mismo, puede transferirse a una planta receptora adecuada por cualquier método disponible. Por ejemplo, puede transferirse la secuencia de ácido nucleico cruzando una planta de tomate donadora con una planta receptora, 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 descendientes que comprenden el QTL divulgado en la presente y que muestran firmeza de los frutos aumentada. Para métodos transgénicos de transferencia, una secuencia de ácido nucleico que comprende un QTL para firmeza de los frutos aumentada, o parte que confiere firmeza de los frutos aumentada del mismo, 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 receptora 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.

55 La transformación de plantas en general implica la construcción de un vector de expresión que funcionará en células vegetales. En el asunto divulgado en la presente, dicho vector comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende un QTL para firmeza de los frutos aumentada, o parte que confiere firmeza de los frutos aumentada del mismo, que es un vector que puede comprender un gen que confiere firmeza 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 contenidos en las combinaciones codifique firmeza de los frutos aumentada. 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 firmeza de los frutos aumentada usando métodos de transformación conocidos en la técnica, tales como el sistema de transformación de *Agrobacterium*.

Los autores de la invención han caracterizado QTL1 a nivel molecular e identificaron varios genes candidatos putativos para su uso en un vector de expresión. La lista de genes candidatos es la siguiente: cisteína proteinasa de tipo catepsina B, aldehído deshidrogenasa de betaína, pectato liasa, unión de ADN de hélice-bucle-hélice. Las coordenadas genómicas de estos genes candidatos son 56434422..56432592, 57902443..57894787, 56396337..56398488 y 57713477..57715822, respectivamente.

Los vectores de expresión pueden incluir al menos un gen marcador, unido de forma funcional a un elemento regulador (tal como un promotor) que permite que las células transformadas que contienen el marcador se recuperen por selección negativa (inhibiendo el crecimiento de células que no contienen el gen marcador de selección), o por selección positiva (cribando el producto codificado por el gen marcador). Muchos genes marcadores de selección habitualmente usados para la transformación de plantas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, genes que codifican enzimas que destoxifican metabólicamente un agente químico selectivo que puede ser un antibiótico o un herbicida, o genes que codifican una diana alterada que es insensible al inhibidor. Se conocen varios métodos de selección positiva en la técnica, tal como selección por manos. Como alternativa, puede usarse transformación sin marcador para obtener plantas sin los genes marcadores mencionados anteriormente, cuyas técnicas también son conocidas en la técnica.

Un método para introducir un vector de expresión en una planta se basa en el sistema de transformación natural de *Agrobacterium* (véase, por ejemplo, Horsch *et al.*, 1985). *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias del suelo patógenas de plantas que transforman genéticamente células vegetales. Los plásmidos Ti y Ri de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, respectivamente, portan genes responsables de la transformación genética de la planta (véase, por ejemplo, Kado, 1991). Los métodos de introducción de vectores de expresión en tejido vegetal incluyen la infección directa o cocultivo de células vegetales con *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch *et al.*, 1985). Se proporcionan descripciones de sistemas de vectores de *Agrobacterium* y métodos para la transferencia génica mediada por *Agrobacterium* por Gruber y Crosby, 1993, Moloney *et al.*, 1989 y la patente de Estados Unidos n.º 5 591 616. Pueden encontrarse descripciones generales de vectores de expresión en plantas y genes indicadores y protocolos de transformación y descripciones de sistemas de vector de *Agrobacterium* y métodos para transferencia génica mediada por *Agrobacterium* en Gruber y Crosby, 1993. Se proporcionan métodos generales de cultivo de tejidos vegetales, por ejemplo, por Miki *et al.*, 1993 y por Phillips *et al.*, 1988. Un libro de texto de referencia para técnicas de clonación molecular y vectores de expresión adecuados es Sambrook y Russell, (2001).

Otro método para introducir un vector de expresión en una planta se basa en transformación mediada por microproyectiles, en la que se transporta ADN sobre la superficie de los microproyectiles. El vector de expresión se introduce en tejidos vegetales con un dispositivo balístico que acelera los microproyectiles hasta velocidades de 300 a 600 m/s que es suficiente para penetrar las paredes de las células vegetales y las membranas (véase, por ejemplo, Sanford *et al.*, 1987; Klein *et al.*, 1988; Sanford, 1988; Sanford, 1990; Klein *et al.*, 1992; Sanford *et al.*, 1993). Otro método para introducir ADN en plantas es mediante sonicación de células diana (véase Zhang *et al.*, 1991). Como alternativa, pueden usarse liposomas o fusión de esferoplastos para introducir vectores de expresión en plantas (véase, por ejemplo, Deshayes *et al.*, 1985 y Christou *et al.*, 1987). También se ha informado de la captación directa de ADN en protoplastos usando precipitación de CaCl₂, poli(alcohol vinílico) o poli-L-ornitina (véase, por ejemplo, Hain *et al.* 1985 y Draper *et al.*, 1982). También se ha descrito la electroporación de protoplastos y células completas y tejidos (D'Halluin *et al.*, 1992 y Laursen *et al.*, 1994).

Otras técnicas bien conocidas tales como el uso de BAC, en las que partes del genoma del tomate se introducen en cromosomas artificiales bacterianos (BAC), es decir, vectores usado para clonar fragmentos de ADN (de 100 a 300 kb de tamaño de inserto; promedio de 150 kb) en células de *Escherichia coli*, basadas en el plásmido de factor F de origen natural encontrado en la bacteria *E. coli* (Zhao y Stodoisky, 2004) pueden emplearse, por ejemplo, en combinación con el sistema de BAC Bi (Hamilton, 1997) para producir plantas transgénicas. Un ejemplo de un vector de sobreexpresión es 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 construcciones de sobreexpresión, la secuencia correspondiente al marco abierto de lectura completo del gen candidato implicado en la modulación de la firmeza de los frutos de tomate puede clonarse delante del promotor de 35S de CaMV usando el sistema de clonación Gateway que evita la necesidad de sitios de restricción. Dicha construcción también contiene el terminador de CaMV en el extremo opuesto. Para la producción de construcciones de iARN, un fragmento de la secuencia codificante única para el gen candidato implicado en la modulación de la firmeza de los frutos de tomate puede clonarse, por ejemplo, en el vector iARN del sistema Gateway pK7GWIWG2(I).

Después de la transformación de los tejidos diana de tomate, la expresión de los genes marcadores de selección descritos anteriormente permite la selección preferente de células, tejidos y/o plantas transformadas, usando métodos convencionales de regeneración y selección.

5 También se proporcionan 4 genes cuyos niveles de expresión están alterados en recombinantes con mayor firmeza de los frutos. Los 4 genes codifican la cisteína proteínasa de tipo catepsina B, aldehído deshidrogenasa de betaína, pectato liasa, unión de ADN de hélice-bucle-hélice. Las coordenadas genómicas de estos genes candidatos son 56434422..56432592, 57902443..57894787, 56396337..56398488 y 57713477..57715822, respectivamente.

10 La presente divulgación, por lo tanto, proporciona una secuencia de nucleótidos aislada seleccionada del grupo que consiste en: a) una secuencia de nucleótidos correspondiente a la región promotora y/o marco abierto de lectura o parte del mismo correspondiente a las siguientes preferiblemente derivadas de *S. pennellii*: cisteína proteínasa de tipo catepsina B, aldehído deshidrogenasa de betaína, pectato liasa, unión de ADN de hélice-bucle-hélice; 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 comprende al menos 21 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de a); d) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de cualquiera de las secuencias de nucleótidos a) a c); y e) una secuencia de nucleótidos que es el complemento de las secuencias de nucleótidos de una cualquiera de a) a d). En un aspecto, la secuencia de nucleótidos de la etapa b) es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de a).

15 En un aspecto, la secuencia de nucleótidos aislada de la divulgación es cisteína proteínasa de tipo catepsina B. En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos aislada de la invención es aldehído deshidrogenasa de betaína. En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos aislada de la invención es pectato liasa. En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos aislada de la invención es unión de ADN de hélice-bucle-hélice. La secuencia de nucleótidos aislada de la divulgación deriva preferiblemente de *S. pennellii*.

20 También se proporciona un vector que comprende la secuencia de nucleótidos aislada de la invención. En un aspecto, la secuencia de nucleótidos aislada está en la orientación codificante. En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos aislada está en la orientación no codificante.

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

También se proporciona una planta transgénica o parte de la misma que comprende una célula hospedadora de la invención. En un aspecto, la planta transgénica o parte de la misma es una monocotiledónea. En otro aspecto, la planta o parte de la misma es una dicotiledónea, por ejemplo, un tomate.

30 También se proporciona un método para producir una planta transgénica que comprende regenerar una planta a partir de una célula 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 divulgación.

35 También se proporciona un método de manipulación de la textura de los frutos de una planta transgénica, por ejemplo, una planta de tomate, que comprende transformar dicha planta con un vector de la invención. En un aspecto, la velocidad de maduración de los frutos está aumentada en comparación con frutos de una planta no transformada. En otro aspecto, la velocidad de maduración de los frutos está disminuida en comparación con frutos de una planta no transformada. En un aspecto, la velocidad de maduración del tomate se mide en estado de irrupción.

40 También se proporciona una planta, por ejemplo, una planta de tomate o parte de la misma por un método de la divulgación.

45 También se proporciona un método de detección de marcadores genéticos indicativos de la textura del tomate de una planta de la familia *Solanaceae*, 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 una secuencia aislada de la invención; 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 detección de marcadores genéticos de la divulgación.

50 También se proporciona el uso de un marcador genético de la invención para la producción de una planta de tomate cultivada que puede albergar frutos.

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

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

5 También se proporciona el uso de una secuencia de nucleótidos aislada de la divulgación en la manipulación de la velocidad de maduración del fruto de una planta, preferiblemente una planta de tomate, en el que dicha manipulación se logra por modificación genética de dicha planta.

También se proporciona el uso de un método de acuerdo con la divulgación, en el que dicha modificación genética se introduce en una planta de la invención por un método seleccionado de la lista que consiste en mutagénesis por inserción de transposón, mutagénesis por inserción de ADN T, TILLING, mutagénesis dirigida al sitio, evolución dirigida y recombinación homóloga. En un aspecto, la modificación genética se introduce por TILLING.

10 Producción de plantas de tomate con firmeza aumentada de los frutos por métodos no transgénicos

En algunos aspectos, para producir una planta de tomate con firmeza de los frutos aumentada, puede usarse fusión de protoplastos para la transferencia de ácidos nucleicos de una planta donadora a una planta receptora. La fusión de protoplastos es una unión inducida o espontánea, tal como una hibridación somática, entre dos o más protoplastos (cuyas paredes celulares se eliminan por tratamiento enzimático) para producir una célula individual binucleada o multinucleada. La célula fusionada, que incluso puede obtenerse con especies de plantas que no pueden cruzarse en la naturaleza, se cultiva de forma tisular en una planta híbrida que muestra la combinación deseable de rasgos. Más específicamente, puede obtenerse un primer protoplasto de una planta de tomate u otra línea de plantas que muestre firmeza de los frutos aumentada. Puede obtenerse un segundo protoplasto de una segunda planta de tomate u otra variedad de planta, preferiblemente una línea de plantas de tomata que comprende características comercialmente valiosas. Los protoplastos entonces se fusionan usando procedimientos tradicionales de fusión de protoplastos, que son conocidos en la técnica.

Como alternativa, puede emplearse rescate de embriones en la transferencia de un ácido nucleico que comprende uno o más QTL como se describe en este documento de una planta de tomate donadora a una planta de tomate receptora. El rescate de embriones puede usarse como procedimiento para aislar embriones de cruces en los que las plantas no logran producir semillas viables. En este proceso, el ovario fertilizado o semilla inmadura de una planta se cultiva de forma tisular para crear nuevas plantas (Pierik, 1999). El asunto divulgado en la presente también se refiere a métodos para producir plantas de tomate con firmeza de los frutos aumentada, que comprenden realizar un método para detectar la presencia de un QTL ligado a firmeza de los frutos aumentada en una planta de tomate donadora como se describe en este documento, y transferir una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un QTL así detectado, o una parte que confiere firmeza de los frutos aumentada del mismo, de una planta donadora a una planta de tomate receptora. La transferencia de la secuencia de ácido nucleico puede realizarse por cualquiera de los métodos descritos previamente en este documento.

Un aspecto ejemplar de dicho método comprende la transferencia por introgresión de la secuencia de ácido nucleico de una planta de tomate donadora en una planta de tomate receptora cruzando las plantas. Esta transferencia, por tanto, puede conseguirse adecuadamente usando técnicas tradicionales de mejoramiento. Los QTL se someten a introgresión en algunos aspecto en variedades comerciales de tomate usando selección asistida por marcador (MAS) o mejoramiento asistido por marcador (MAB). MAS y MAB implican el uso de uno o más de los marcadores moleculares para la identificación y selección de esas plantas descendientes que contienen uno o más de los genes que codifican el rasgo deseado. En el contexto del asunto divulgado en la presente, dicha identificación y selección se basan en el QTL del asunto divulgado en la presente o marcadores asociados con el mismo. También puede usarse MAS para desarrollar líneas casi isogénicas (NIL) que albergan el QTL de interés, que permiten un estudio más detallado del efecto de cada QTL y también se un método eficaz para el desarrollo de poblaciones de línea endogámica por retrocruzamiento (BIL) (véase, por ejemplo, Nesbitt y Tanksley, 2001; van Berloo *et al.*, 2001). Las plantas de tomate desarrolladas de acuerdo con estos aspectos pueden obtener ventajosamente una mayoría de sus rasgos de la planta receptora, y obtener la firmeza de los frutos aumentada de la planta donadora. Como se analiza en este documento, pueden usarse técnicas tradicionales de mejoramiento para someter a introgresión una secuencia de ácido nucleico que codifica firmeza de los frutos aumentada en una planta de tomate receptora. En algunos aspectos, una planta de tomate donadora que muestra firmeza de los frutos aumentada y que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica firmeza de los frutos aumentada se cruza con una planta de tomate receptora que, en algunos aspectos, muestra características comercialmente deseables.

La población de plantas resultante (que representa los híbridos F1) entonces se autopoliniza y determina las semillas (semillas F2). Las plantas F2 cultivadas a partir de las semillas F2 entonces se criban para firmeza de los frutos aumentada por métodos conocidos para los expertos en la materia.

55 Pueden desarrollarse líneas de plantas de tomate con firmeza de los frutos aumentada usando las técnicas de selección recurrente y retrocruzamiento, autopolinización y/o dihaploides, o cualquier otra técnica usada para generar líneas precursoras. En un método de selección recurrente y retrocruzamiento, la firmeza de los frutos aumentada puede someterse a introgresión en una planta receptora diana (el progenitor recurrente) cruzando el progenitor recurrente con una primera planta donadora, que difiere del progenitor recurrente y se menciona en este

documento como "progenitor no recurrente". El progenitor recurrente es una planta que no tiene firmeza de los frutos aumentada, pero posee características comercialmente deseables.

5 En algunos aspectos, el progenitor no recurrente muestra firmeza de los frutos aumentada y comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica firmeza de los frutos aumentada. El progenitor no recurrente puede ser cualquier variedad de planta o línea endogámica que tiene fertilidad cruzada con el progenitor recurrente.

10 La descendencia resultante de un cruce entre el progenitor recurrente y progenitor no recurrente se retrocruza con el progenitor recurrente. La población de plantas resultante entonces se criba para firmeza de los frutos aumentada. Puede realizarse selección asistida por marcador (MAS) usando uno o más de los marcadores moleculares descritos en este documento, o usando sondas de hibridación, o polinucleótidos para identificar la descendencia que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica firmeza de los frutos aumentada. Además, puede usarse MAS para confirmar los resultados obtenidos de las mediciones cuantitativas de firmeza de los frutos.

15 Después del cribado, las plantas híbridas F1 que muestran un fenotipo o, en algunos aspectos, genotipo de firmeza de los frutos aumentada y, por tanto, comprenden la secuencia de ácido nucleico requerida que codifica firmeza de los frutos aumentada, se seleccionan entonces y retrocruzan con el progenitor recurrente durante varias generaciones para permitir que la planta de tomate se vuelva gradualmente endogámica. Esto proceso puede realizarse durante dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más generaciones. En principio, la descendencia resultante del proceso de cruce del progenitor recurrente con el progenitor no recurrente de firmeza de los frutos aumentada es heterocigótica para uno o más genes que codifican firmeza de los frutos aumentada.

En general, un método de introducción de un rasgo deseado en una variedad de tomate híbrida puede comprender:

20 (a) cruzar un progenitor de tomate endogámico, preferiblemente *S. lycopersicum*, con otra planta de tomate, preferiblemente *S. pennellii*, que comprende uno o más rasgos deseados, para producir plantas de la descendencia F1, en el que el rasgo deseado es firmeza de los frutos aumentada;

25 (b) seleccionar la plantas de la descendencia F1 que tienen el rasgo deseado para producir plantas de la descendencia F1 seleccionadas, en algunos aspectos usando marcadores molecular como se describe en este documento;

(c) retrocruzar las plantas de la descendencia seleccionadas con la planta progenitora de tomate endogámica para producir plantas de la descendencia de retrocruzamiento;

30 (d) seleccionar plantas de la descendencia de retrocruzamiento que tienen el rasgo deseado y características morfológicas y fisiológicas de la planta progenitora de tomate endogámica, en el que la selección comprende el aislamiento de ADN genómico y ensayara el ADN para la presencia de al menos un marcador molecular para QTL1, en algunos aspectos como se describe en este documento;

(e) repetir las etapas (c) y (d) dos o más veces en sucesión para producir plantas de la descendencia de tercer retrocruzamiento o mayor seleccionadas;

35 (f) opcionalmente autopolinizar descendencia de retrocruzamiento seleccionada para identificar plantas homocigóticas; y

(g) cruzar al menos una de las plantas de la descendencia de retrocruzamiento o autopolinizadas con otra planta progenitora de tomate endogámica para generar una variedad de tomate híbrida con el rasgo deseado y todas las características morfológicas y fisiológicas de variedad de tomate híbrida cuando se cultivan en las mismas condiciones ambientales.

40 Como se indica, la última generación de retrocruzamiento puede autopolinizarse para proporcionar descendencia de línea pura homocigótica (endogámica) que tiene firmeza de los frutos aumentada. Por tanto, el resultado de la selección recurrente, retrocruzamiento y autopolinización es la producción de líneas que son genéticamente homogéneas para los genes ligados a firmeza de los frutos aumentada y, en algunos aspectos, también otros genes ligados a rasgos de interés comercial.

45 Por consiguiente, se proporciona un método de producción de una planta de tomate que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento.

50 En un aspecto específico se proporciona un método de producción de una planta de tomate que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento, que comprende las etapas de realizar un método para detectar un QTL ligado a firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento, y transferir un ácido nucleico que comprende al menos un QTL así detectado, de una planta de tomate donadora a una planta de tomate receptora, en el que dicha firmeza de los frutos aumentada se mide en los frutos de una planta de tomate cultivada descendiente en comparación con frutos de una planta de tomate de control.

En un aspecto específico se proporciona un método de producción de una planta de tomate cultivada que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento, en el que dicha transferencia de ácido nucleico se realiza por transformación, por fusión de protoplastos, por una técnica de haploide duplicado o por rescate de embriones.

- 5 En un aspecto específico se proporciona un método de producción de una planta de tomate cultivada que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento, en el que el intervalo de firmeza de los frutos en la planta de tomate descendiente es hasta 4 veces mayor que el de los frutos de una planta de tomate de control en el estado de recolección. Como alternativa, el intervalo de firmeza de los frutos en la planta de tomate descendiente es hasta 2 veces mayor que el de los frutos de una planta de tomate de control en el estado de recolección. Preferiblemente, el estado de recolección es el estado de irrupción más 7 días. Como alternativa, el estado de recolección puede ser el estado verde inmaduro, estado de expansión rápida, estado de irrupción o estado de maduración rojo o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días después de cualquiera de estos estados.

- 15 En un aspecto específico se proporciona un método de producción de una planta de tomate que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento, en el que el intervalo de firmeza de los frutos permanece hasta la irrupción más 7 días.

En un aspecto adicional se proporciona un método de producción de una planta de tomate que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento, en el que la planta donadora es *S. pennellii* y la planta receptora es *S. lycopersicum*.

- 20 También se proporciona un método de producción de una planta de tomate que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento, en el que dicho QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.

También se proporciona un método de producción de una planta de tomate que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento, en el que dicho QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN NT3374FM, TG246 y NT5880VC; que está presente únicamente en el pericarpio exterior.

- 25 También se proporciona un método de producción de una planta de tomate que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento, en el que dicho QTL está ligado a al menos uno de los marcadores de ADN NT3374FM y TG246; que está presente únicamente en el pericarpio exterior.

En un aspecto adicional se proporciona una planta de tomate, o parte de la misma, obtenible por un método como se describe en este documento.

- 30 En un aspecto adicional se proporciona una planta de tomate cultivada que comprende un QTL responsable de firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento.

En un aspecto adicional se proporciona una planta de tomate híbrida, o parte de la misma, obtenible por cruce de una planta de tomate como se describe en este documento con una planta de tomate que muestra características comercialmente deseables.

- 35 En un aspecto adicional se proporciona una semilla de tomate producida por cultivo de la planta de tomate como se describe en este documento.

En un aspecto adicional se proporciona una semilla de tomate producida por cruce de la planta de tomate cultivada como se describe en este documento con una planta que tiene rasgos fenotípicos deseables para obtener una planta que tenga firmeza de los frutos significativamente aumentada en comparación con una planta de control.

- 40 En un aspecto adicional se proporciona el uso de un QTL como se describe en este documento para la producción de plantas de tomate que tengan firmeza de los frutos aumentada en comparación con plantas de control.

En un aspecto adicional se proporciona el uso de una planta de tomate que tiene firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento para expandir la brecha de recolección de los frutos de tomate. La brecha de recolección puede expandirse en uno cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días.

- 45 En un aspecto adicional se proporciona el uso de una planta de tomate que tiene firmeza de los frutos aumentada como se describe en este documento en el mercado de productos frescos o para el procesamiento de alimentos.

En un aspecto adicional se proporciona alimento procesado hecho a partir de una planta de tomate que comprende el al menos un QTL como se describe en este documento.

Aspectos de la invención

- 50 Aspecto 1: un fruto de tomate con firmeza de los frutos significativamente aumentada en el estado de recolección, ligada a un elemento genético en la planta de tomate cultivada que produce dicho fruto de tomate, en el que dicha

firmeza es hasta 4 veces mayor que la de un fruto de una planta de tomate de control que no tiene dicho elemento genético.

Aspecto 2: un fruto de tomate de acuerdo con el aspecto 1, en el que el estado de recolección es el estado de irrupción más 7 días.

5 Aspecto 3: un fruto de tomate de acuerdo con el aspecto 1 o 2, en el que la firmeza de los frutos es hasta 3 veces mayor que la producida a partir de una planta de tomate de control que no tiene dicho elemento genético y preferiblemente en el que la firmeza de los frutos es menor en el estado de irrupción que la producida a partir de una planta de tomate de control que no tiene dicho elemento genético.

10 Aspecto 4: un fruto de tomate de acuerdo con el aspecto 1 a 3, en el que la firmeza de los frutos es hasta 2 veces mayor que la producida a partir de una planta de tomate de control que no tiene dicho al menos un elemento genético.

Aspecto 5: un fruto de tomate de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1 a 4, en el que dicho intervalo de firmeza se mide en irrupción más 14 días.

15 Aspecto 6: un fruto de tomate de acuerdo con cualquier aspecto precedente, en el que el al menos un elemento genético está ubicado en el cromosoma 3.

20 Aspecto 7: una planta de tomate cultivada que produce frutos de tomate de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1 a 6, en la que dicha planta puede caracterizarse por a) el elemento genético está ligado a al menos un marcador de ADN seleccionado del grupo que consiste en TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42 y/o b) el elemento genético es complementario al elemento genético correspondiente en la línea de *Solanum pennellii* IL3-4 depositada con un número de acceso LA3489, en la que dicho elemento genético en LA3489 está ligado a al menos un marcador de ADN seleccionado del grupo que consiste en TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.

Aspecto 8: una planta de tomate cultivada de acuerdo con el aspecto 7, en la que el al menos un elemento genético es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN NT3374FM, TG246 y NT5880VC.

25 Aspecto 9: una planta de tomate cultivada de acuerdo con el aspecto 7 u 8, en la que el QTL es QTL1 que está presente únicamente en el pericarpio exterior.

Aspecto 10: una planta de tomate cultivada de acuerdo con cualquier aspecto previo, en la que el elemento genético, o parte del mismo, corresponde a la región promotora de la pectato liasa de *S. pennellii* o la secuencia de marco abierto de lectura.

30 Aspecto 11: una planta de tomate cultivada de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 7 a 10, en la que dicha planta es endogámica, dihaploide o híbrida.

Aspecto 12: una planta de tomate cultivada de acuerdo con el aspecto 11, en la que dicha planta tiene esterilidad masculina.

35 Aspecto 13: una planta de tomate cultivada de acuerdo con cualquier aspecto previo, en la que el fruto de tomate con firmeza de los frutos significativamente aumentada y el fruto de la planta de tomate de control no tienen diferencia significativa en el color de fruto en el estado de irrupción más 7 días.

Aspecto 14: una semilla de tomate que produce una planta de tomate cultivada de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 7 a 13.

Aspecto 15: parte vegetal de una planta de tomate cultivada de acuerdo con el aspecto 7 a 13.

40 Aspecto 16: material vegetal obtenible de una parte vegetal de una planta de tomate cultivada de acuerdo con el aspecto 15.

45 Aspecto 17: un método para detectar un QTL ligado a firmeza de los frutos significativamente aumentada en frutos de una planta de tomate cultivada en comparación con una planta de tomate de control, que comprende las etapas de a) cruzar una planta de tomate donadora con una planta de tomate receptora para proporcionar plantas de tomate cultivadas descendientes, b) determinar cuantitativamente la firmeza en el fruto de dichas plantas descendientes, c) establecer un mapa de ligamiento genético que ligue la firmeza de los frutos aumentada observada con la presencia de al menos un marcador de ADN de dicha planta donadora en dichas plantas descendientes y d) asignar a un QTL los marcadores de ADN en dicho mapa que están ligados a firmeza de los frutos significativamente aumentada.

50 Aspecto 18: el método de acuerdo con el aspecto 17, en el que dicha planta donadora tiene una firmeza de los frutos significativamente aumentada en comparación con dicha planta receptora.

- Aspecto 19: el método del aspecto 17 o 18, en el que la planta donadora es *Solanum pennellii* y la planta receptora es *Solanum lycopersicum*.
- 5 Aspecto 20: el método de uno cualquiera de los aspectos 17 a 19, en el que el intervalo de firmeza de los frutos en las plantas descendientes es hasta 4 veces mayor que el de los frutos producidos a partir de una planta de tomate de control en el estado de recolección.
- Aspecto 21: el método del aspecto 20, en el que el intervalo de firmeza de los frutos en las plantas descendientes es hasta 2 veces mayor que el de los frutos producidos a partir de una planta de tomate de control en el estado de recolección.
- 10 Aspecto 22: el método de uno cualquiera de los aspectos 17 a 21, en el que el estado de recolección es el estado de irrupción más 7 días.
- Aspecto 23: el método de uno cualquiera de los aspectos 17 a 22, en el que el al menos un marcador de ADN se encuentra en *Solanum pennellii*.
- Aspecto 24: el método de uno cualquiera de los aspectos 17 a 23, en el que el al menos un marcador de ADN se selecciona de TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.
- 15 Aspecto 25: el método de uno cualquiera de los aspectos 17 a 24, en el que dicho QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.
- Aspecto 26: el método del aspecto 25, en el que dicho QTL es QTL1 que está presente únicamente en el pericarpio exterior.
- 20 Aspecto 27: un QTL responsable de la firmeza de los frutos aumentada en frutos proporcionados por una planta de tomate cultivada detectado por un método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 17 a 26.
- Aspecto 28: un QTL de acuerdo con el aspecto 27 ubicado en el cromosoma 3.
- Aspecto 29: un QTL de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 27 a 28 asociado con al menos un marcador de ADN seleccionado del grupo que consiste en TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.
- 25 Aspecto 30: un QTL de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 27 a 29, en el que dicho QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.
- Aspecto 31: un QTL de acuerdo con el aspecto 30, en el que dicho QTL es QTL1 que está presente únicamente en el pericarpio exterior.
- Aspecto 32: una muestra de ADN aislada obtenida de una planta de tomate que comprende un QTL de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 27 a 31.
- 30 Aspecto 33: un método de producción de una planta de tomate cultivada que proporciona frutos con firmeza de los frutos significativamente aumentada de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1 a 6.
- 35 Aspecto 34: un método de producción de una planta de tomate cultivada que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada de acuerdo con el aspecto 33, que comprende las etapas de realizar un método para detectar un QTL asociado con firmeza de los frutos significativamente aumentada de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 17 a 26, y transferir un ácido nucleico que comprende al menos un QTL así detectado, de una planta de tomate donadora a una planta de tomate receptora, en el que dicha firmeza de los frutos aumentada se mide en frutos de una planta de tomate cultivada descendiente en comparación con frutos de una planta de tomate de control.
- 40 Aspecto 35: un método de producción de una planta de tomate cultivada que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 33 a 34, en el que dicha transferencia de ácido nucleico se realiza por transformación, por fusión de protoplastos, por una técnica de haploide duplicado o por rescate de embriones.
- 45 Aspecto 36: un método de producción de una planta de tomate cultivada que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 33 a 35, en el que el intervalo de firmeza de los frutos en la planta de tomate donadora es hasta 4 veces mayor que el de los frutos de una planta de tomate de control en el estado de irrupción más 7 días, y preferiblemente en el que el intervalo de firmeza de los frutos en la planta de tomate donadora es menor que el de los frutos de una planta de tomate de control en el estado de irrupción.
- 50 Aspecto 37: un método de producción de una planta de tomate cultivada que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 33 a 36, en el que el intervalo de firmeza de los frutos se mide en estado de irrupción más 14 días.

Aspecto 38: un método de producción de una planta de tomate cultivada que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 33 a 37, en el que la planta donadora es *Solanum pennellii* y la planta receptora es *Solanum lycopersicum*.

5 Aspecto 39: un método de producción de una planta de tomate cultivada que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 33 a 38, en el que dicho QTL es QTL1 ligado a al menos uno de los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246, NT5880VC y TG42.

Aspecto 40: un método de producción de una planta de tomate cultivada que proporciona frutos con firmeza de los frutos aumentada de acuerdo con el aspecto 39, en el que dicho QTL es QTL1 que está presente únicamente en el pericarpio exterior.

10 Aspecto 41: una planta de tomate cultivada, o parte de la misma, obtenible por un método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 33 a 40.

Aspecto 42: una planta de tomate cultivada que comprende un QTL responsable de la firmeza de los frutos aumentada de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 27 a 31.

15 Aspecto 43: una planta de tomate híbrida, o parte de la misma, obtenible cruzando una planta de tomate cultivada de acuerdo con los aspectos 7 a 13 con una planta de tomate que muestra características comercialmente deseables.

Aspecto 44: semilla de tomate producida cultivando la planta de tomate del aspecto 43.

Aspecto 45: semilla de tomate producida cruzando la planta de tomate de uno cualquiera de los aspectos 7 a 13 y 43 a 44 con una planta que tiene rasgos fenotípicos deseables para obtener una planta que tenga firmeza de los frutos significativamente aumentada en comparación con una planta de control.

20 Aspecto 46: uso de un QTL de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 27 a 31 para la producción de plantas de tomate que tengan firmeza de los frutos significativamente aumentada en comparación con plantas de tomate de control.

Aspecto 47: uso de una planta de tomate de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 7 a 13 y 43 a 44 para ampliar la brecha de recolección de los frutos de tomate.

25 Aspecto 48: uso de una planta de tomate de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 7 a 13 y 43 a 44 en el mercado de productos frescos o para el procesamiento de alimentos.

Aspecto 49: uso de un fruto de tomate de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1 a 6 en el mercado de productos frescos o para el procesamiento de alimentos.

30 Aspecto 50: alimento procesado preparado a partir de una planta de tomate que comprende el al menos un elemento genético de acuerdo con los aspectos 7 a 13.

Líneas depositadas

Las siguientes muestras de semillas se depositaron en NCIMB, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Escocia, R.U. según las disposiciones del Trados de Budapest en nombre de Syngenta Participations AG:

35 *Solanum lycopersicum* CV M82, número de depósito NCIMB 41661 el 22 de octubre de 2009.

Solanum lycopersicum Q7774, número de depósito NCIMB 41949 el 21 de marzo de 2012.

Referencias

Batu, A. y Thompson, A.K. 1998 Effects of modified atmospheric packaging on post harvest qualities of pink tomatoes, Tr. J. Agr. & Forestry, 22, 365-372

40 Causse M, Saliba-Colombani V, Lecomte L, Duffé P, Rousselle P, Buret M. (2002) QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. J Exp Bot. Oct;53(377):2089-98

45 Chanthasombath T, Sanatem K, Phomachan C, Acedo Jr. A y Weinberger K, (2008) Postharvest Life of Breaker and Turning Tomatoes Subjected to Transient Modified Atmosphere Proc. EURASIA Sym. on Quality Management in Postharvest Systems. Acta Hort. 804, ISHS 2008

Chi W, Ma J, Zhang D, Guo J, Chen F, Lu C, y Zhang L (2008) The Pentatricopeptide Repeat Protein DELAYED GREENING1 Is Involved in the Regulation of Early Chloroplast Development and Chloroplast Gene Expression in Arabidopsis Plant Physiol. 147: 573-584.

- Christou P, Murphy JE, y Swain WF (1987) Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3962-3966.
- Deshayes A, Herrera-Estrella L, Caboche M (1985) Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid. *EMBO J.* 4:2731-2737.
- 5 D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505. Dik AJ, Koning G, Kohl J (1999) Evaluation of microbial antagonists for biological control of tomato cinerea stem infection in cucumber and tomato. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:115-122.
- Draper J, Davey MK, Freeman JP, Cocking EC y Cox BJ (1982) Ti plasmid homologous sequences present in tissues from *Agrobacterium* plasmid-transformed *Petunia* protoplasts. *Plant and Cell Physiol.* 23:451-458.
- 10 Eckstein F (ed) (1991) *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach.* Oxford Univ. Press, NY 1991.
- Eriksson EE, Bovy A, Manning K, Harrison L, Andrews J, De Silva J, Tucker GA y Seymour GB (2004) Effect of the Colorless non-ripening Mutation on Cell Wall Biochemistry and Gene Expression during Tomato Fruit Development and Ripening. *Plant Physiology* 136:4184-4197
- Eshed Y, Zamir D (1994) A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *S. pennellii*: a tool for fine mapping of genes. *Euphytica.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1994 79: 175-179
- 15 Exama, A., Arul, J., Lencki, R.W., Lee, L.Z. y Toupin, C. 1993. Suitability of plastic films for modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 58: 1365-1370.
- Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap Evd, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD (2000) fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science Washington.* 2000; 289: 85-88.
- 20 Fridman E, Carrari F, Liu YS, Fernie AR, Zamir D (2004) Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* 305: 1786-1789.
- Geeson, J.D., Browne, K.M., Maddison, K.I., Shepherd, J. y Guaraldi, F. 1985. Modified atmosphere packaging to extend the shelf life of tomatoes. *J. Food Technol.* 20:339-349.
- Glick BR y Thompson JE (eds) (1993) Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants in *Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology*, CRC Press, pp. 67-88.
- 25 Gruber MY, Crosby WL (1993) Vectors for Plant Transformation. En: Glick BR y Thompson JE (Eds.) *Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology*, CRC Press, pág. 89-119.
- Hain R, Stabel P, Czernilofsky AP, Steinbliss HH, Herrera-Estrella L, Schell J (1985) Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene to plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 199:161-168.
- 30 Hamilton CM (1997) A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. *Gene* 200:107-116
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholts D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.
- Kado CI (1991) Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Crit. Rev. Plant Sd.* 10:1-32.
- 35 King, G.J., Lynn, J.R., Dover, C.J., Evans, K.M. y Seymour, G.B. (2001). Resolution of quantitative trait loci for mechanical measures accounting for genetic variation in fruit texture of apple (*Malus pumila* Mill). *Theoretical and Applied Genetics* 102:1227-1235.
- Klein TM, Gradziel T, Fromm ME, Sanford JC (1988). Factors influencing gene delivery into zea mays cells by high velocity microprojectiles. *Biotechnology* 6:559-563-
- 40 Klein TM, Arentzen R, Lewis PA, y Fitzpatrick-McEUIgott S (1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Bio/Technology* 10:286-291.
- Knapp S (2005) New nomenclature for *Lycopersicon* http://sgn.cornell.edu/about/solanum_nomenclature.pl
- Laursen CM, Krzyzek RA, Flick CE, Anderson PC, Spencer TM (1994) Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells. *Plant Mol Biol.* 24(1):51-61.
- 45 Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A.J., King, G.J., Giovannoni, J.J. y Seymour, G.B. (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics* 38:948-952.

- Miki BL, Fobert PF, Charest PJ, Iyer VN (1993) Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants. En: Glick BR y Thompson JE (Eds.) *Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology*, CRC Press, pág. 67-88.
- Moloney MM, Walker JM, Sharma KK (1989) High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports* 8:238-242.
- 5 Nesbitt TC, Tanksley SD (2001) fw2.2 directly affects the size of developing tomato fruit, with secondary effects on fruit number and photosynthate distribution. *Plant Physiol.* 127: 575-583.
- Paterson AH (1996) Making genetic maps. En: Paterson AH (ed) *Genome mapping in plants*. RG Landes, San Diego, pág. 23-39
- 10 Pearson WR (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* 183: 63-98.
- Phillips RL, Somers DA, Hibberd KA. 1988. Cell/tissue culture and in vitro manipulation. En: G.F. Sprague y J. W. Dudley, eds. *Corn and corn improvement*, 3.^a ed., pág. 345-387. Madison, WI, EE. UU., American Society of Agronomy.
- Pierik RLM (1999) *In vitro Culture of Higher Plants*, 4.^a edición, 360 páginas, ISBN:0-7923-5267-X.
- 15 Sambrook J, y Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Nueva York, NY, EE. UU., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Particulate Sd. Technol.* 5:27-37.
- Sanford JC (1988) The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 6:299-302.
- 20 Sanford JC (1990) Biolistic plant transformation. *Physiologica Plantarum* 79: 206-209.
- Sanford JC, Smith FD, y Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology* 217:483-509.
- Smith T, Waterman M (1981) Identification of common Molecular Sequences *J. Mol. Biol.* 147, 195-197.
- 25 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). Molecular and genetic characterisation of a novel pleiotropic tomato ripening mutant. *Plant Physiology* 120:383-389.
- Tijssen P (1993) Hybridization With Nucleic Acid Probes. Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation. En: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier.
- 30 Tsuchimoto S, van der Krol AR y Chua NH. Ectopic Expression of pMADS3 in Transgenic *Petunia* Phenocopies the *Petunia* blind Mutant (1993) *Plant Cell* 5, 843-853.
- Van Berloo R, Aalbers H, Werkman A, Niks RE (2001) Fruit firmness QTL confirmed through development of QTL-NILs for barley leaf rust fruit firmness. *Mol. Breeding* 8: 187-195
- van Ooijen JW, Maliepaard C (1996) MapQTL® versión 4.0: Programa informático para el cálculo de posiciones de QTL en mapas genéticos. CPRO-DLO, Wageningen
- 35 van Oijen JW, Voorrips RE (2001) JoinMap® 3.0: Programa informático para el cálculo de mapas de vinculación genética. *Plant Research International*, Wageningen, Países Bajos
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J (2002) A MADS-Box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato Ripening-Inhibitor (Rin) Locus. *Science* 296: 5566, 343 - 346.
- 40 Wang S., C. J. Basten, y Z.-B. Zeng (2007). Windows QTL Cartographer 2.5 Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>)
- Zhang L, Cheng L, Xu N, Zhao M, Li C, Yuan J, y Jia S (1991) Efficient transformation of tobacco by ultrasonication. *Biotechnology* 9:996-997.
- Zhao S, y Stodolsky M (2004) "Bacterial Artificial Chromosomes," *Methods in Molecular Biology*, Vol. 255, Humana Press Inc., Totowa, N.J., EE. UU.
- 45 Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 94: 176-183

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación de QTL de firmeza de los frutos en IL de *S. pennellii*

5 Para identificar nuevos QTL de textura, se cribaron líneas de introgresión de *S. pennellii* usando el ensayo de punción de pericarpio (PPT) para la firmeza de los frutos, con la línea precursora *S. lycopersicum* 'M82' como referencia. Se registraron aumentos ($P < 0,001$) en la firmeza para IL de *S. pennellii* que incluyen el crom. 3 (IL3-4). Esto indicó un QTL robusto, que es independiente de la influencia ambiental. La firmeza de los frutos en plantas IL3-4 (crom. 3) fue constante entre dos ensayos de invernadero independientes en Reino Unido, que demuestra la reproducibilidad con una significación estadística de $P < 0,001$. Curiosamente, no se encontraron diferencias significativas en el color de los frutos entre IL3-4 y M82 ($P < 0,05$). Los efectos de textura en IL3-4 están confinados al pericarpio exterior y la magnitud de los efectos se muestra en la Fig. 1.

El efecto de textura de *S. pennellii* parece ser semidominante en individuos heterocigóticos (Fig. 2).

Ejemplo 2

Cartografiado fino de QTL de textura en IL de *S. pennellii*

15 El QTL de crom. 3 se cartografió en zona 3F (Eshed y Zamir, 1995) y se cartografió de forma precisa usando 41 QTL-Nil de IL 3-4 (Fig. 3). Se usaron marcadores basados en PCR diseñados para secuencias de RFLP para construir el mapa genético de crom. 3, zona 3F usando JoinMap® 3.0 y este se ligó al mapa físico usando la secuencia del genoma de tomate, v2.31 (<http://solgenomics.net/>). También se usó cartografiado de intervalos para cartografiar de forma precisa los QTL de textura del pericarpio exterior e interior del crom. 3. Se resolvió un QTL de textura significativo ($P < 0,001$) y fue evidente únicamente en el pericarpio exterior. Este QTL de textura se cartografió en un intervalo de 2,1 Mb entre los marcadores TG599 y TG42. Hasta donde se sabe, este es el primer QTL de crom. 3 de firmeza de los frutos que se describe en *S. pennellii*. Además, se ensayó la textura de las líneas QTL-NIL y se obtuvieron mediciones mecánicas basadas en la carga máxima para el pericarpio exterior de frutos de maduración rojo (irrupción + 7 días) (Fig. 4). Fue evidente variación sustancial en la firmeza de los frutos entre QTL-NIL y las líneas precursoras M82 e IL 3-4 (Fig. 4). Las QTL-Nil se genotiparon usando marcadores basados en CAPS, SSR y PCR y para cada QTL-NIL, se visualizó la ubicación genómica y el tamaño del segmento de *S. pennellii* sometido a introgresión en Excel (Fig. 5).

Se generó un mapa de QTL para el pericarpio exterior usando el marcador TG246 y usando los marcadores de SSR NT1819, NT1434, NT1743, NT3374, NT5880, NT4324, NT0247, NT1234. Las secuencias de cebador directo e inverso para cada uno de estos marcadores se muestran a continuación en la tabla 1, junto con su posición física en el cromosoma 3.

Tabla 1

SSR	cebador directo	cebador inverso	INICIO	FIN
NT1819	CATCTTGGGAATCTGACCC	AGCTTTCCAGTTCTGACCG	60959804	60960031
NT1434	TGGTAGAAGCTGAATTGGG	AAAGCATCTATGGCTGTCTG	61572820	61573046
NT1743	ATGGGCGCACTATTATGA	GGGTCAACCGATCTCA		57086487
NT3374	AGCATACTGTGATGGGTTT	TTTTACCGTTTGACCTTG	57086348	57086500
NT5880	ATCGGTGCTTGATAAACGGT	TAGCTGCAATTGCCAAGAAA	57216738	57216840
NT4324	TGCGTACGTACTCTCTTTT	AGGCGTATGTAATAAGCTAAG	57454274	57454207
NT0247	TGGTTCTGGAACCTTGCTATC	TTTGAGTAAAAACGCCATCG	57510882	57511291
NT1234	AACGATGCACCAGTTTCAC	ATGTAGCCAGGTCCATTTG	57689859	57690052

Las secuencias de cebadores para el marcador TG246 son las siguientes:

35 TG246F TTCCTCATCCGAAAAGCAAC
TG246R TCTCATTGCAATTAACGATTCC

Las secuencias de cebadores para TG599 son las siguientes:

TG599F TCATGAACAAAATTGCGACA

TG599R TCCTTCTCAATTGACCAAACC

5 También se usaron cebadores para amplificar el gen de la pectato liasa para la generación de plantas transgénicas. Estos son PL2F (ACGCGTTTAATTGGACGTATG) y PL2R (AACAGAGGAAGTGCCCATG).

Se generaron más marcadores y se usaron para genotipar las QTL-NIL, pero no se usaron para generar el mapa de QTL del pericarpio exterior.

Ejemplo 3

Genes candidatos en el intervalo de cartografiado

10 Se realizó un experimento en matriz usando el GeneChip de tomate de 10 000 elementos público. Este experimento indicó genes que se expresaban de forma diferencial en la región de cartografiado del QTL de textura de IL3-4 (véase la tabla 2 a continuación). El gen candidato más probable para firmeza de los frutos aumentada encontrado en el intervalo de cartografiado es pectato liasa.

Tabla 2

Nota	ID del locus	Media de la réplica (M82) ± error típico	Media de la réplica (IL3-4) ± error típico	Cambio factorial
Solyc03g111730 56434422..56432592	Cisteína proteinasa de tipo catepsina B	2742,6 ± 58,66	32,65 ± 5,57	-84,01
Solyc03g113800 57902443..57894787	Aldehído deshidrogenasa de betaína	5890,77 ± 66,36	99,55 ± 24,87	-59,17
Sin ajuste claro al ensamblaje de secuencia		9245 ± 352,59	303,65 ± 117,65	-30,45
Solyc03g111690 56396337..56398488	Pectato liasa	13182,67 ± 197,72	690,17 ± 133,15	-19,1
Solyc03g113560 57713477..57715822	Unión de ADN de hélice-bucle-hélice	120,13 ± 6,94	11,59 ± 3,35	-10,37

15

Ejemplo 4

Material vegetal

20 Se generaron las líneas de introgresión de *S. pennellii* por Eshed y Zamir (1995) por retrocruzamiento repetido de la especie silvestre *S. pennellii* (LA716) con el progenitor recurrente de *S. lycopersicum* 'M82'. Las semillas para estas IL se obtuvieron de D. Zamir (Universidad Hebrea de Jerusalén). La población (IL-pen) consistía en 75 líneas, que contienen cada una un fragmento de introgresión único de *S. pennellii* LA716 en el fondo genético de M82, una variedad de tomate de procesamiento con crecimiento definido (Eshed y Zamir, 1995). Las líneas se cultivaron en Reino Unido en condiciones convencionales de invernadero (16 h de tiempo diurno, temp. diurna 20 °C y temp. nocturna 18 °C). Las plantas se cultivaron en macetas de 7,5 litros de Levington, maceta M2/abono de lecho. Riego complementado con Vitax 214. La población se plantó en cuatro bloques que contienen cada uno una planta. Se marcaron cuatro frutos de cada línea en irrupción y se recolectaron siete días después en el estado de maduración rojo. Las condiciones ambientales dentro del invernadero se registraron en todo el experimento y se incluyeron en el análisis estadístico.

25

Ejemplo 5

30 **Población de cartografiado de IL 3-4**

Se usó un total de 41 QTL-NIL derivadas de una población de cartografiado de IL 3-4 x M82 F₂ para el cartografiado fino del QTL de textura. Las plantas de cultivaron en otoño de 2009/verano de 2010 en condiciones convencionales de invernadero. Se marcaron al menos cuatro furtos por línea en irrupción y se recolectaron siete días después.

Ejemplo 6

5 Ensayo de penetración en pericarpio (PPT)

Se realizó análisis fenotípico en las IL de *S. pennellii* cultivadas en condiciones de invernadero en Reino Unido. Se cortó una sección transversal de 6 mm de cada fruto y se midió la carga máxima (fuerza requerida para penetrar el tejido del pericarpio a 10 mm/minuto) usando una máquina Lloyd Instrument LRF+ (Lloyd, R.U.) equipada con una celda de carga de 10 N y sonda de 1,6 mm. Se tomaron mediciones por separado del pericarpio exterior e interior por duplicado. También se registró el peso de los frutos, la posición en el racimo y el color. El color se midió usando un Chroma Meter (Minolta).

Ejemplo 7

Extracción de ADN genómico

Se extrajo el ADN genómico usando el protocolo descrito por Fulton *et al.* 1995. En resumen, se recogió material foliar fresco y joven en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se molió junto con una solución miniprep que contenía tampón de extracción de ADN, tampón de lisis de núcleos, Sarkosyl (5 %) y bisulfito de sodio. Las muestras trituradas se incubaron a 65 °C durante 1 a 2 horas, y se añadió inmediatamente cloroformo isoamílico (24:1). Después de centrifugación, se mantuvo únicamente la fase acuosa del sobrenadante. Posteriormente, se usó isopropanol para precipitar el ADN. Después de una segunda etapa de centrifugación, se usó etanol (70 %) para limpiar los sedimentos de ADN antes de la dilución final en TE (10:1). La concentración de ADN (10 ng/μl) se estimó por digestión enzimática, usando dos muestras de ADN de concentraciones conocidas como controles. Como alternativa, se recogieron hojas pequeñas no expandidas en plantas de recogida de 96 pocillos de Qiagen con una bola de acero inoxidable de 3 mm y 600 μl de tampón de extracción (Tris-HCl 1 M pH 7,5, NaCl 4 M, EDTA 0,5 M, SDS al 10 %) antes de la molienda en un molino de bolas durante 3 minutos. El sobrenadante se aclaró por centrifugación a 5600 g durante 20 minutos antes de que precipitaran 300 μl con un volumen igual de isopropanol a temperatura ambiente durante 3 min. Los ácidos nucleicos se recogieron por centrifugación a 5600 g durante 20 minutos, se lavaron en EtOH al 70 % y 100 % antes del secado y resuspensión en tampón TE (10:1) que contenía 12 mg/ml de RNasa.

Ejemplo 8

30 Caracterización molecular de material vegetal

Se realizó análisis molecular principalmente usando marcadores basados en PCR. Se diseñaron cebadores usando secuencias de marcadores de RFLP, CAPS y COS disponibles en la red SOL genomics (<http://solgenomics.net/>), usando el mapa genético de tomate EXP-2000 como referencia para la ubicación de nuevos marcadores. Este mapa genético se construyó basándose en un cruce interespecífico entre dos especies de *Solanum*, *lycopersicum* y *pennellii* (Fulton *et al.* 2002; Tanksley *et al.* 1992). Los productos de PCR se secuenciaron o examinaron por ensayo de polimorfismos conformacionales monocatenarios (SSCP) usando Sequa Gel® MD (National Diagnostics, U.K Ltd) y se visualizaron por tinción con plata (Bassam *et al.* 1991). Se diseñaron marcadores de dCAPS como se describe por Neff *et al.* (2002). Para otros marcadores, se usó un protocolo de detección de SNP para detectar sustituciones de nucleótidos específicas en las QTL-NIL recombinantes. En análisis de estos SNP se realizó usando Genalys 2.0 (Takahashi y Matsuda, 2001). La mezcla de reacción de PCR general incluía 1,5 microlitros de ADN genómico (10 ng/μl), 5 unidades de tampón de reacción 5x, 2,5 unidades de MgCl₂ 25 mM, 1,25 unidades de dNTP 5 mM, 0,5 unidades de cada cebador directo e inverso 10 μM, 0,25 unidades de enzima goTaq (5 u/μl) y agua miliQ componiendo un volumen total de 25 microlitros. Un protocolo de amplificación general para todos los marcadores basados en PCR fue el siguiente: inicio caliente a 95 °C durante 4 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a temperatura de hibridación y 30 segundos de prolongación a 75 °C; con una prolongación final a 75 °C durante 4 minutos. Los fragmentos digeridos de los marcadores de dCAPS se visualizaron usando luz UV después de migración en un gel de agarosa al 2,5 %, teñido en una solución de bromuro de etidio. También se usaron marcadores de microsatélites (SSR) en este experimento. Antes de la amplificación de los fragmentos, se marcaron los cebadores inversos con 33P como se describe por Hodgson y Fisk (1987). Posteriormente, se usó un protocolo de amplificación similar antes de la separación de los fragmentos en un gel de poliacrilamida; y visualización usando un revelador de película Kodak. Se usó un marcador de RFLP siguiendo el procedimiento de marcaje descrito por Hodgson y Fisk (1987). El marcaje, la hibridación y el revelado de la película fueron similares a lo descrito por Cheng *et al.* (2003).

Ejemplo 9

Análisis estadístico y de QTL

5 Se analizaron poblaciones basadas en *S. pennellii* usando análisis de componentes de varianza de probabilidad máxima residual (REML) (Patterson y Thompson, 1971) que tiene en cuenta factores ambientales tales como intensidad de la luz, temperatura y humedad junto con la posición de la parcela en una parcela aleatorizada, el número de racimos de la planta, la fecha de recogida, el peso y color para los rasgos de textura usando GenStat Edición 9.1 (Lawes Agricultural Trust, Rothamsted Experimental Station). La carga máxima se analizó por separado para el pericarpio interior y exterior después de transformación logarítmica de los datos. La significación se determinó a partir del coeficiente t basado en la media de la población con respecto al progenitor recurrente. El ensayo de ji al cuadrado para los rasgos de dominancia recuperó un valor P bilateral con un grado de libertad.

10 La población de cartografiado de IL 3-4 se analizó como anteriormente, las medias predichas generadas del REML para cada línea QTL-NIL se usaron en el análisis. Se calcularon mapas de ligamiento a partir de las frecuencias de recombinación (0,4) y un LOD de 3.0 en JoinMap[®] 3.0 (van Ooijen y Voorrips 2001). El análisis de QTL se realizó usando MapQTL[®] versión 5.0. (van Ooijen, 2004). Se realizó cartografiado de intervalos en un grupo de ligamiento creado después de la construcción del mapa de crom. 3 usando JoinMap[®] 3.0 (van Ooijen y Voorrips 2001). Se generaron puntuaciones de LOD por un ensayo de permutación (1000 ciclos) para determinar la ubicación genómica de QTL con un intervalo de confianza de un 95 %.

Lista de secuencias

- <110> King Faisal Specialist Hospital and Research Center
- 20 <120> Un método para generar células madre pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos
- <130> K31627WO
- <160> 1
- <170> BiSSAP 1.3.2
- <210> 1
- 25 < 211> 212
- < 212> PRT
- < 213> Homo sapiens
- <223> "interleucina-6"
- <220>
- 30 < 223> interleucina-6

ES 2 727 932 T3

<400> 1

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
 20 25 30
 Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
 35 40 45
 Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
 50 55 60
 Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
 65 70 75 80
 Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
 85 90 95
 Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
 100 105 110
 Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
 115 120 125
 Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
 130 135 140
 Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
 145 150 155 160
 Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
 165 170 175
 Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His
 180 185 190
 Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala
 195 200 205
 Leu Arg Gln Met
 210

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para seleccionar una planta de tomate cultivada que comprende QTL1 ligado a firmeza de los frutos aumentada en comparación con frutos de una planta de tomate de control que no comprende dicho QTL1, en el que dicho método comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar una muestra de ADN genómico de una planta de tomate;
 - b) detectar en la muestra de ADN genómico la presencia de al menos un marcador de ADN ligado a QTL1;
- 10 en el que dicho marcador de ADN se selecciona de la lista que comprende los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246 y NT5880VC.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la detección en la etapa b) comprende realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico en el ADN genómico usando un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 19-20 para el marcador de ADN TG599, las SEQ ID NO: 7-8 para el marcador de ADN NT3374FM, las SEQ ID NO: 17-18 para el marcador de ADN TG246 y las SEQ ID NO: 9-10 para el marcador de ADN NT5880VC.
- 15
3. Uso de un marcador de ADN para detectar la presencia de alelos de firmeza de los frutos aumentada en QTL1; en el que dicho marcador de ADN se selecciona de la lista que comprende los marcadores de ADN TG599, NT3374FM, TG246 y NT5880VC.
- 20

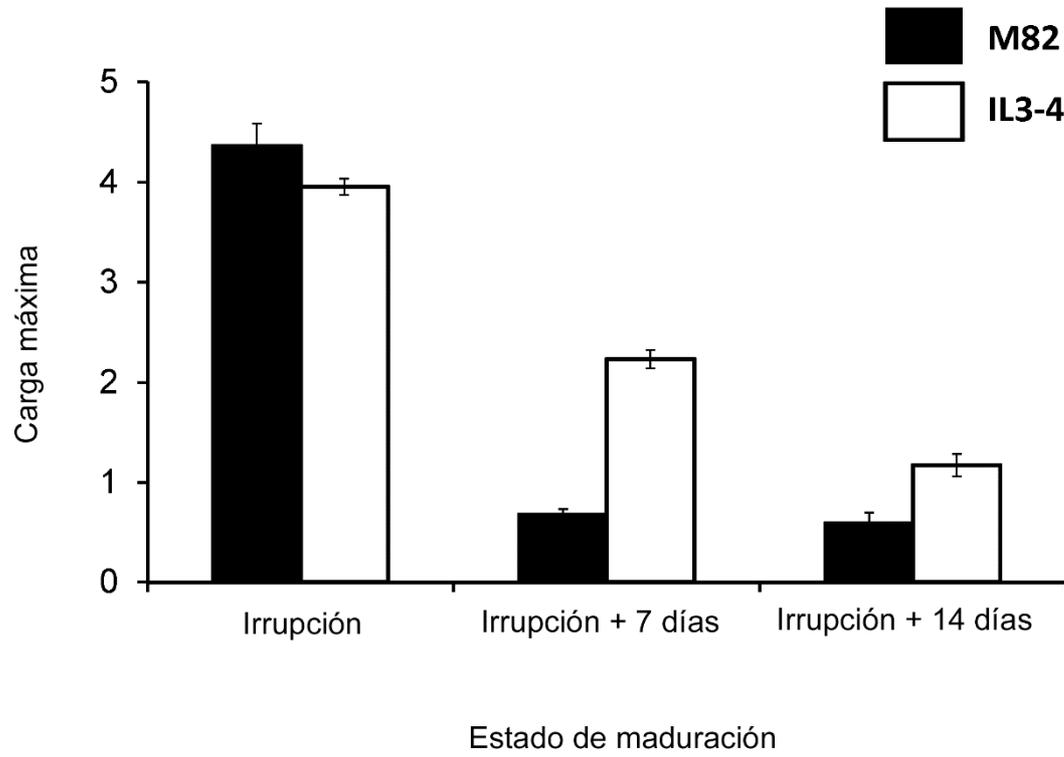


Fig. 1

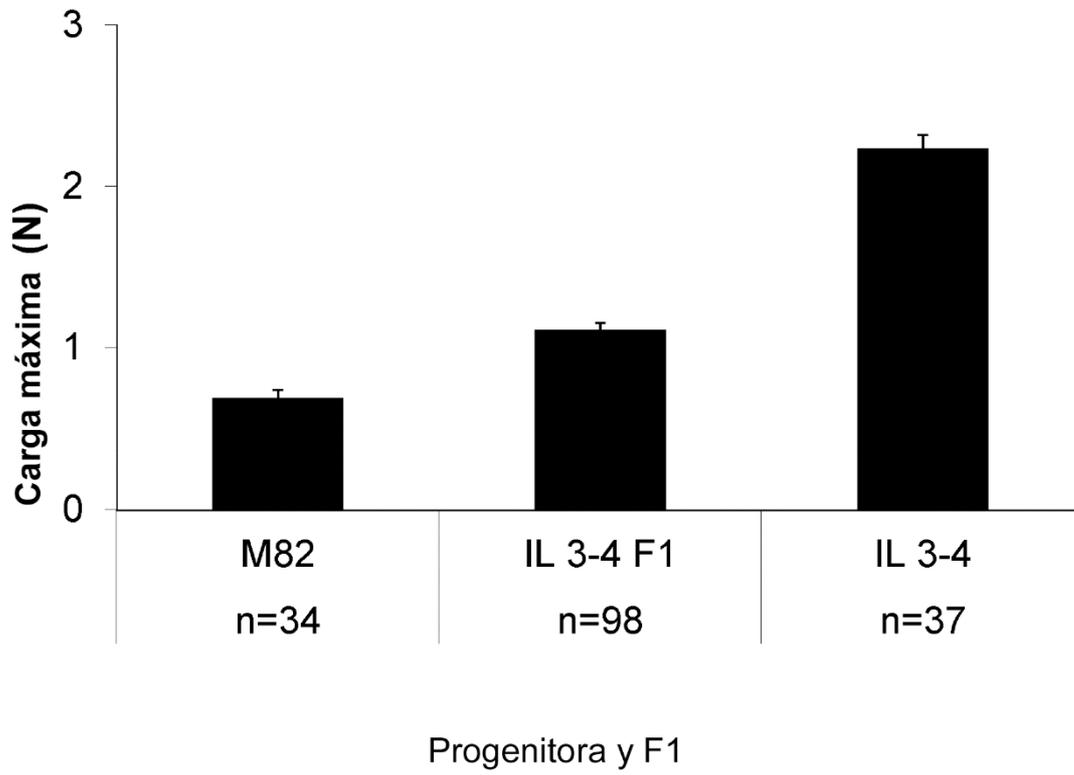


Fig. 2

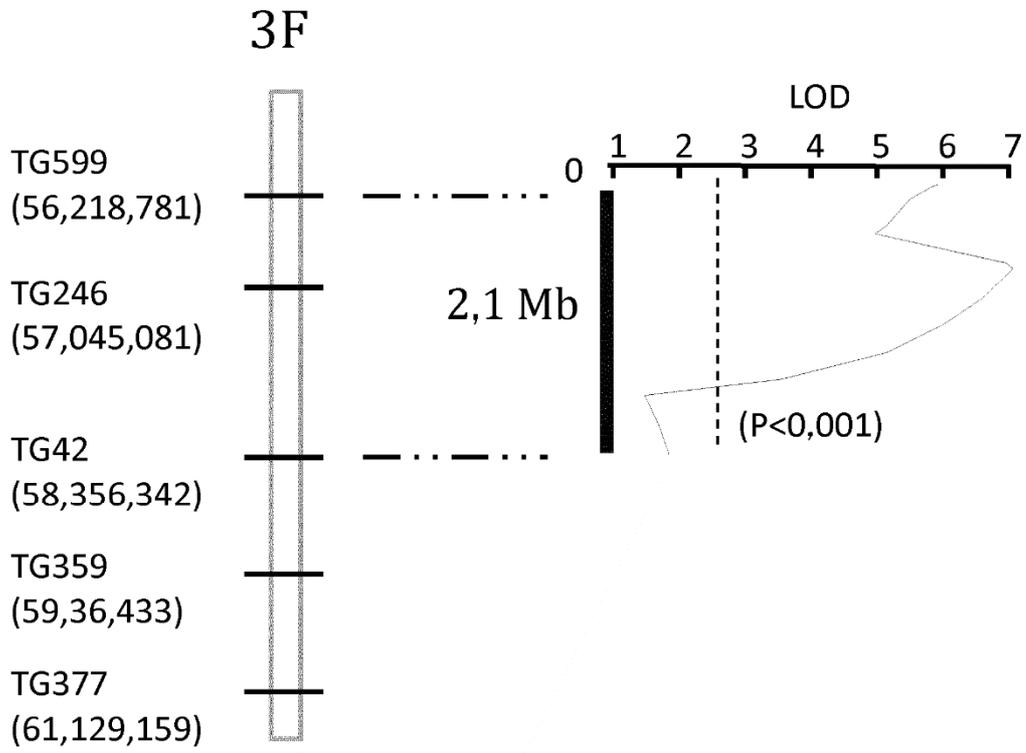


Fig. 3

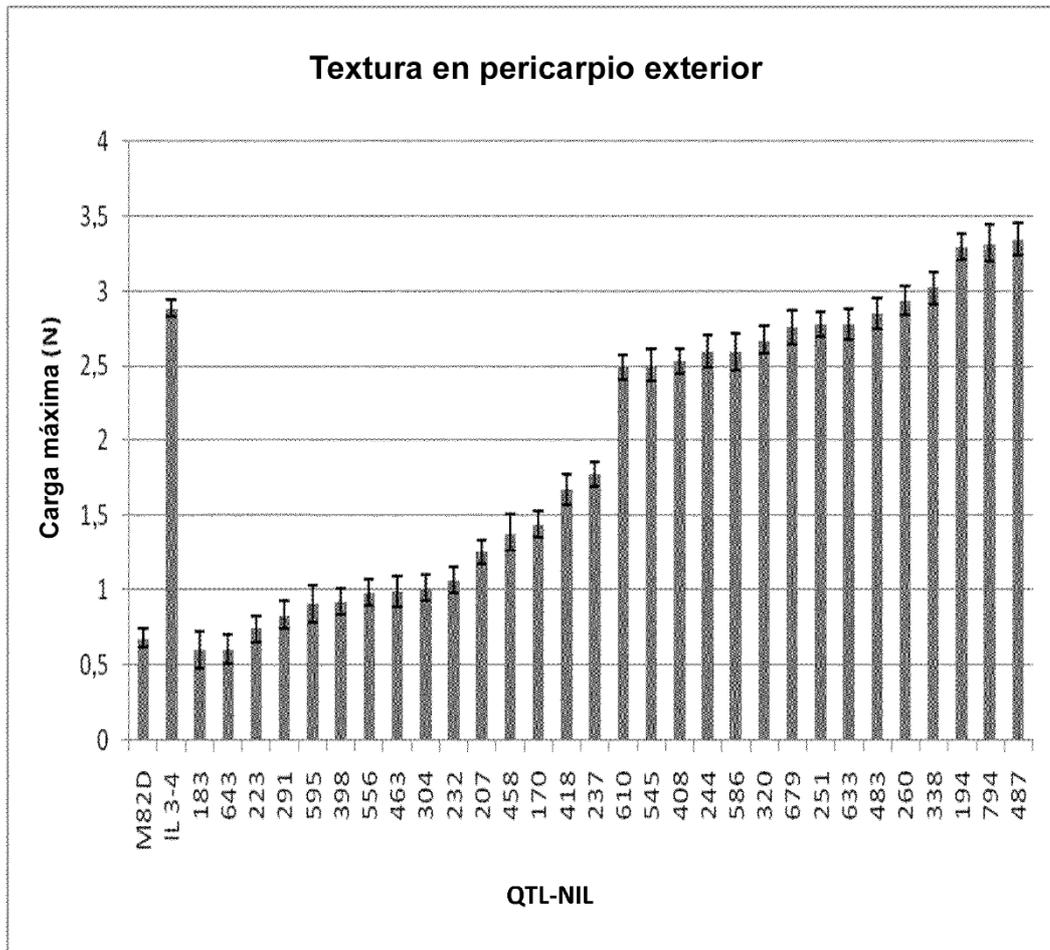


Fig. 4

QTL-ANL	Q276	Q272	Q283	645	Q591	Q84	Q590	Q281	Q328	Q377	Q241	Q626	Q626	Q647	Q371	Q467	Q574	Q725	Q765	Q558	Q720	Q1937	Q581	Q774	Q294	Q1945
Plant ID	183	640	223	251	595	338	463	304	207	458	170	418	275	610	408	244	596	310	679	251	633	483	263	328	194	487
NT134FM	A	*	A	A	*	A	A	A	A	A	A	A	A	*	B	B	*	B	*	B	*	A	B	A	B	B
NT327FM	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Marker S3.1.1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	*	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Marker S1.1.1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	*	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
TC246	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	*	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
NT582VC	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
NT452ND	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
NT524FM	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
NT123FM	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
TC359	B	B	B	A	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B
NT526FM	B	B	B	A	B	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B
NT139PT	B	*	B	A	*	B	A	*	A	A	A	A	A	A	A	A	B	*	A	*	A	*	B	A	A	*
NT383VC	B	B	B	A	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	B	B
NT582VC	B	B	B	A	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B	B	B	B
NT524PT	B	*	B	A	*	B	A	*	A	A	A	A	A	*	A	A	*	B	*	A	*	A	*	B	A	A
NT452ND	B	B	B	A	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	A	B	B	B	B	B	B	B
NT114FM	B	B	*	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
NT143VC	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Fig. 5