

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 323 028**

21 Número de solicitud: 200501603

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/08 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **23.06.2005**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **03.07.2009**

Fecha de la concesión: **22.06.2010**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
03.06.2010

45 Fecha de anuncio de la concesión: **08.07.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
08.07.2010

73 Titular/es: **Universidad Politécnica de Valencia
CTT-Edificio 6G - Camino de Vera, s/n
46022 Valencia, ES
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología
Agraria y Alimentaria,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(CSIC) y
Universidad de Almería**

72 Inventor/es: **Ellul, Philippe;
Angosto Trillo, Trinidad;
García Sogo, Begoña;
Martín Trillo, Mar;
Martínez Zapater, José Miguel;
Lozano Ruiz, Rafael y
Moreno Ferrero, Vicente**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Método para la obtención de cultivares de tomate con frutos partenocárpicos (sin semillas) y mayor calidad organoléptica.**

57 Resumen:

Método para la obtención de cultivares de tomate con frutos partenocárpicos (sin semillas) y mayor calidad organoléptica.

El método se basa en la transferencia y expresión del gen LFY de *Arabidopsis thaliana* en plantas transgénicas de tomate. Los frutos de las plantas transgénicas con el gen LFY mantienen el mismo tamaño y peso que los del cultivar original, pero carecen de semillas, tienen más carne, menos pulpa y una forma ligeramente apuntillada. El análisis de calidad refleja un incremento del 60% en el contenido en sólidos solubles (la media alcanza 6,12 °Brix) y del 60% en ácidos valorables (la media llega al 0,72%), lo que indica una mejora de la calidad organoléptica de los frutos en comparación con los del cultivar original no transgénico. Además, los frutos de las plantas transgénicas tienen otros atributos que indican una mayor calidad, tales como un mayor contenido en azúcares (sobre todo glucosa y fructosa) y licopeno, una sustancia que tiene propiedades antioxidantes.

ES 2 323 028 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método para la obtención de cultivares de tomate con frutos partenocárpicos (sin semillas) y mayor calidad organoléptica.

Área de aplicación

La presente invención describe la obtención de plantas de tomate con frutos partenocárpicos (sin pepitas o semillas) mediante transferencia y expresión del gen LFY de *Arabidopsis thaliana*. Además de la ausencia de semillas, los frutos de estas plantas muestran un incremento de la calidad (debido a un aumento de sólidos solubles, acidez, mayor contenido en glucosa y fructosa y mayor concentración de licopeno) y mantienen el peso medio característico del cultivar original (p73) no transgénico.

Estado de la técnica*Mejora del sabor de los frutos de tomate*

El sabor de los frutos del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es un carácter complejo que guarda una relación directa con su composición química. El incremento en el contenido en sólidos solubles totales (SST) y en ácidos valorables suele estar correlacionado con el incremento de sabor (Saimbhi *et al.*, 1995).

Gracias a la mejora tradicional, por cruzamientos entre parentales y selección de la descendencia, los cultivares modernos de tomate son híbridos adaptados a las cadenas de producción-consumo que producen frutos de buena apariencia (calibre, coloración) y larga vida post-cosecha (LSL). Sin embargo, la obtención de variedades con estas características se ha realizado sacrificando la calidad organoléptica o sensorial de los frutos (Diez & Nuez, 1995). Por ello, la recuperación de los atributos de calidad constituye hoy en día uno de los objetivos prioritarios en la mejora genética del tomate.

La mejora tradicional ha tenido un éxito muy limitado en este sentido debido a la relación negativa entre producción y contenido en sólidos solubles (Stevens 1979, 1986). La utilización de germoplasma de especies silvestres relacionadas, principalmente de *Lycopersicon chmielewskii* y *L. cheesmanii*, parece esperanzadora (Nuez, 1995). A partir de híbridos entre *L. esculentum* y estas especies silvestres, se han derivado líneas con un alto contenido en sólidos solubles (Risck, 1974; Hewitt & Garvey, 1987, Poysa, 1993) que se están utilizando actualmente en programas de mejora. Sin embargo, la naturaleza compleja del carácter y el ligamiento de algunos de los genes que lo controlan el contenido en SST con otros que determinan caracteres agronómicamente indeseables (eg. baja producción o reducción del calibre del fruto) dificulta notablemente su manejo en los programas de mejora (Ibarbia & Lambeth, 1969; Tanksley & Hewitt, 1988; Paterson *et al.*, 1988; 1991; Goldman *et al.*, 1995).

Obtención de frutos partenocárpicos

Unos de los objetivos más relevantes en la mejora del tomate es la obtención de frutos partenocárpicos, es decir frutos sin semillas. En tomate, la formación de frutos sin semillas se puede conseguir artificialmente (Bangerth & Sjuit, 1978) y suele ser una práctica habitual. Se logra mediante aplicación de auxinas como el ácido 4-clorofenoxiacético (4CPA) o el ácido 2-hidroximetil-4-clorofenoxiacético (HCPA) a los racimos florales de tomate. Sin embargo, los frutos partenocárpicos obtenidos por este método son de pobre calidad debido al escaso desarrollo de la pulpa y a una carne esponjosa insípida.

La segunda posibilidad consiste en aprovechar la partenocarpia natural debida a causas genéticas, que puede ser obligatoria o facultativa, es decir dependiente de las condiciones ambientales o de la interacción entre las condiciones ambientales y el genotipo (Ho & Hewitt, 1986). Se han descrito dos cultivares (“Severianin” y “RP75/59”) como posibles fuentes de variación para aprovechar la partenocarpia facultativa (Maisonneuve, 1978). Mediante mejora tradicional se han conseguido tres cultivares partenocárpicos derivados de “Severianin”: “Freda” (Costa *et al.*, 1992), “Oregon Star” y “Oregon Pride” (Bagget *et al.*, 1995). En estos casos, el mayor inconveniente es la dependencia que muestran estos cultivares de condiciones subóptimas para respuestas como son la formación de polen, la polinización o la fecundación, como pueden ser las temperaturas bajas (Mohamed, 1998). Factores tan variables como la duración del día, la intensidad y la calidad de la luz y las interacciones entre temperatura y luz pueden jugar un papel clave en dichas respuestas y limitar la producción de frutos sin semillas.

Para explicar la partenocarpia en “Severianin” se ha propuesto un modelo genético sencillo, según el cual el carácter estaría controlado por un simple gen, denominado *pat-2* (Lin, 1982; Lin *et al.*, 1984; Catalá y Nuez, 1990). Otros autores sugieren la intervención de un segundo gen (*mp*) presente en los genotipos no partenocárpicos y que podría influir en homocigosis sobre la expresión de *pat-2* (Vardy *et al.*, 1989). En el caso de la línea “RP 75/59” dos genes recesivos (distintos a *pat-2* y *mp*) determinan la expresión de este carácter (Catalá & Nuez, 1990). La clonación y caracterización del gen *pat-2* permitirían estudiar las bases moleculares del proceso de formación de un fruto partenocárpico (Fos & Nuez, 1992), pero hasta la fecha esto no ha sido factible.

Otra alternativa para inducir partenocarpia se basa en la ingeniería genética. Rotino *et al.*, (1997) introducen en tabaco y berenjena, el gen *iaaH* (aislado de *Pseudomonas syringae* pv. *savataoi*) bajo control de una secuencia reguladora específica de óvulos de *Antirrhinum majus* (*DefH9*). De esta forma se induce la síntesis de ácido indol-3-acético (AIA) durante las fases iniciales y el desarrollo del ovario, lo que conduce a la obtención de frutos partenocárpicos en estas dos especies. Sin embargo, la obtención de frutos sin semillas requiere la castración previa de las flores y, además, los autores no comentan ninguna mejora de la calidad de los frutos. En teoría, teniendo en cuenta que el efecto del transgén *iaaH* se basa en el mismo principio que la inducción artificial de partenocarpia, cabe pensar que, en tomate, los frutos partenocárpicos con un nivel excesivo de auxinas endógenas mostrarían una baja calidad, al igual que ocurre en el caso de los frutos sin semillas obtenidos mediante tratamiento con auxinas exógenas.

De hecho, las plantas transgénicas de tomate cv UC82 con la construcción *DefH9-iaaM* producen frutos malformados (Pandolfini *et al*, 2002). Para evitar este problema, los autores no han tenido más remedio que modular la expresión del gen introduciendo una secuencia corriente arriba que, aparentemente, limita su expresión. Con esta nueva construcción (*DefH9RI-iaaM*) los capullos florales de las plantas transgénicas tienen un nivel de auxina endógena 10 veces superior al de los controles, pero 5 veces menor que el de las plantas transfolinadas con la construcción original (*DefH9-iaaM*). Lo interesante de este trabajo es que las plantas transgénicas de tomate con esta nueva construcción (*DefH9RI-iaaM*) producen frutos partenocárpicos con una morfología aparentemente normal (Pandolfini *et al*, 2002). A pesar de ello, con la excepción de la partenocarpia, los frutos no tienen otros atributos que indiquen una mayor calidad con respecto a los del cultivar original.

Descripción de la invención

Teniendo en cuenta la problemática anterior, en la presente invención se describe un método que permite:

- La obtención de frutos de tomate partenocárpicos (sin semillas)
- Una mejora de la calidad de los frutos debido a:
 - Mayor contenido en sólidos solubles y ácidos valorables
 - Mayor contenido en azúcares (principalmente glucosa y fructosa)
 - Mayor contenido en licopeno, una sustancia con propiedades antioxidantes
- Conseguir los atributos anteriores, sin que por ello quede alterado el peso medio del fruto del cultivar original y la producción total por planta.

Descripción detallada de la invención

En plantas transgénicas de tomate con el gen *LFY* hemos observado un acortamiento de la fase juvenil vegetativa. Este adelanto de la floración mediante iniciación floral en meristemas vegetativos ha sido previamente descrito en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Weigel & Nilsson, 1995; Mandel & Yanofsky, 1995), tabaco (Nilsson & Weigel, 1997), álamo (Rottmann *et al.*, 2000), arroz (He *et al.*, 2000) y citrange Carrizo (Peña *et al.*, 2001) que expresan el mismo gen *LFY*. De hecho, en 1997, D. Weigel protege una invención basada en la obtención de “Plantas genéticamente modificadas con una modulación en el desarrollo de los meristemas florales”. En la mencionada patente, el autor describe la precocidad del desarrollo floral en plantas de tabaco que sobreexpresan el gen *LFY* de *Arabidopsis* (U.S. Patent Number 5,637,785; Jun. 10, 1997).

Modificación del patrón de crecimiento

Una característica distintiva y relevante que presentan las plantas transgénicas de tomate con el gen *LFY* es que los brotes axilares crecen hasta aproximadamente la misma distancia del centro de la planta. Esto confiere un porte más compacto a las plantas transgénicas *p35S::LFY* de tomate, muy similar al que tienen las plantas de crecimiento determinado de esta misma especie. Por lo tanto podemos concluir que, mediante la expresión del gen *LFY*, se puede modificar el tipo de crecimiento del tomate: un cultivar de tipo indeterminado (como p73) se puede convertir así en un cultivar de crecimiento determinado (eg. UC82b). Estas plantas no necesitan entutorado ni poda lo que abarata los costes de producción.

La conversión de un patrón de crecimiento indeterminado a determinado se ha conseguido previamente mediante métodos clásicos de mejora introduciendo el gen recesivo *sp* (*selfpruning* o “autopoda”) en cultivares de crecimiento indeterminado. Sin embargo, la introducción del gen *sp* por mejora tradicional implica un programa de retrocruzamientos que supone varios años de trabajo. Mediante la expresión del gen *LFY* por ingeniería genética en plantas transgénicas de tomate se puede conseguir el mismo resultado en un periodo sensiblemente menor (menos de un año).

Obtención de frutos de tomate partenocárpico

La expresión de *LFY* no afecta al desarrollo de las flores. Las plantas transgénicas presentan un número de órganos florales similar al de las plantas testigo. Hemos comprobado también la fertilidad del polen de las plantas transgénicas p35S::*LFY* mediante germinación *in vitro* y se ha conseguido descendencia mediante cruzamiento entre transformantes primarios y plantas de la población original p73.

Un aspecto clave de la presente invención es la ausencia de semillas en los frutos de las plantas transgénicas. Es la primera vez que se describe la obtención de frutos partenocárpico en una planta hortícola mediante la expresión de un gen implicado en la identificación de los meristemas florales.

A nivel agronómico, esta invención tiene varias ventajas con respecto a otros métodos para la obtención de frutos partenocárpico de tomate.

- 15 ■ La inducción artificial de partenocarpia mediante el empleo de reguladores de crecimiento conduce a frutos insípidos y de tipo esponjoso, debido al escaso desarrollo de la pulpa. En cambio, los frutos partenocárpico de las plantas transgénicas con *LFY* no sólo mantienen calidad de los originales sino que incluso la mejoran.
- 20 ■ Respeto a los métodos tradicionales de mejora que se basan en el aprovechamiento de la expresión natural de partenocarpia, la ventaja de nuestra invención es que la expresión del transgén *LFY* se verifica durante todo el desarrollo de la planta y es independiente de factores externos ambientales.
- 25 ■ La obtención de frutos partenocárpico mediante la expresión de genes que conducen a la biosíntesis de auxinas endógenas a lo largo del desarrollo de los frutos (Rotino *et al.*, 1997) es una forma alternativa a la inducción artificial de partenocarpia mediante tratamiento exógeno con reguladores de crecimiento. Las plantas transgénicas de tomate con la construcción *DefH9-iaaM* producen frutos partenocárpico, pero tienen diversas malformaciones (Pandolfini *et al.* 2002). El empleo de una construcción modificada (*DefH9-RI-iaaM*) permite obviar el problema anterior, pero los frutos no son de mejor calidad (Pandolfini *et al.* 2002). Con la estrategia que nosotros presentamos, los frutos partenocárpico tienen, incluso, una mayor calidad que los del cultivar original.
- 30

Mejora de la calidad de los frutos

35 Aumento en el contenido de sólidos solubles. El incremento de un 60% de los grados Brix es de gran relevancia en la mejora del tomate ya que los métodos convencionales de mejora permiten unos incrementos mucho más limitados. Si consideramos que p73 es un cultivar con frutos de baja calidad organoléptica (la media está en torno a 3,7 °Brix), el aumento conseguido en las plantas transgénicas (6,1 °Brix de media) es espectacular. La determinación de °Brix se realiza midiendo el índice de refracción (IR) con un refractómetro (Refractómetro de mano ATAGO N-14), el cual compara la velocidad de la luz que pasa a través de un líquido, con la velocidad a la cual pasa a través del aire.

45 El agua, por ejemplo, tiene un IR de 1.3330, lo que significa que el recorrido de la luz a través del agua es 1.3 veces más lenta que a través del aire.

En este experimento, hemos analizado los °Brix de frutos plantas testigo y transgénicas 35S::*LFY*. La determinación se ha realizado en varios frutos de cada planta.

50 El método consiste en pelar cada fruto, triturarlo y filtrar el triturado con una gasa, de tal forma que sólo recogemos la fase líquida. A continuación colocamos una gota de agua que actuará como testigo (o blanco) y, posteriormente, añadimos una gota del filtrado de tomate. La unidad de dichas medidas serán los °Brix.

55 Hay una relación directa entre el contenido total de sólidos solubles, mayoritariamente azúcares, de la solución analizada (filtrado de tomate) y el IR de aquella solución. La unidad de dichas medidas serán los grados Brix, equivalentes al porcentaje en sólidos solubles, responsables en parte de la calidad organoléptica del fruto. En general los °Brix del tomate cultivado oscilan entre 3,5 y 5.

60 Si este aumento fuera del mismo orden en plantas transgénicas de otros cultivares de tomate con mayor contenido en sólidos solubles totales (existen cultivares comerciales con medias en torno a los 5 - 5,5 °Brix) se podría llegar a unos valores en torno a 8-8,5 °Brix que sólo se alcanzan en los frutos de las especies silvestres de *Lycopersicon* (sin valor comercial) o en algunas líneas de *L. esculentum* (e.g. UPV-3799; Roselló *et al.*, 1999) que, a pesar de su alto contenido en sólidos solubles, tienen un fruto de tamaño pequeño (en torno a los 30 g).

- 65 • Aumento en el contenido de ácidos valorables. Aunque los frutos partenocárpico obtenidos mediante la mejora tradicional pueden alcanzar un alto contenido en sólidos solubles y azúcares, tienen menos acidez que los frutos con semillas.

ES 2 323 028 B2

La anterior desventaja no ocurre en el caso de los frutos de plantas transgénicas 35S::LFY, ya que el aumento del contenido en sólidos solubles se ve acompañado por un incremento del porcentaje de ácidos solubles (en torno al 60%).

5 Conviene resaltar que el contenido en ácidos solubles está también relacionado con el incremento de sabor y que, de hecho, el índice de madurez (SST/acidez total) se ha utilizado frecuentemente como un índice de sabor (Bisogni *et al.*, 1976).

10 La determinación de los ácidos valorables, se realiza, como su nombre indica, mediante la medida de la acidez del filtrado del fruto de tomate por valoración ácido-básica. El método consiste en añadir unas 3-4 gotas de fenolftaleína (un indicador de pH) en una solución de 5 ml de filtrado de tomate + 15 ml de agua destilada. En nuestro caso, la solución de filtrado de tomate diluido con fenolftaleína será incolora por ser ácida. A continuación se añade progresivamente NaOH 0,1 N (utilizando una bureta), hasta el momento que la solución vire de transparente a rosa.

15 Posteriormente, medimos el volumen final de NaOH utilizado y calculamos el porcentaje de ácidos aplicando la siguiente fórmula

$$Z = V \times N \times mEqwt/Y \times 100$$

20

Z: % de ácidos valorables en la muestra

V: volumen gastado de NaOH 0,1 N

25

N: normalidad de NaOH (0,1 N)

mEqwt: miliequivalentes de ácido cítrico (0,064)

Y: volumen de muestra en ml (5 mL)

30

En general el porcentaje de ácidos valorables en frutos de tomate tras la recolección se encuentra en torno al 0,5%.

35

- Aumento en el contenido de azúcares. Los frutos de las plantas transgénicas con el gen LFY tienen un contenido dos veces mayor en glucosa y fructosa que los frutos de las plantas testigo.
- Aumento en el contenido de licopeno. El licopeno es una sustancia que tiene propiedades antioxidantes. Los frutos de las plantas transgénicas tienen un mayor contenido en licopeno que los de las plantas de la población original.

40

Dominancia

La expresión de los nuevos caracteres (partenocarpia y componentes de calidad de los frutos) es de tipo dominante, ya que se verifica en las plantas transgénicas con el gen LFY en las que se ha generado un nuevo locus génico que está en situación de hemiciogosis. Es decir, no hace falta fijar el gen en homocigosis para que aparezca el fenotipo. Esto representa una ventaja adicional con respecto a otros sistemas anteriormente mencionados (por ejemplo, los que se basan en la obtención de frutos partenocárpicos mediante la introducción de genes recesivos).

45

Mantenimiento del peso medio del fruto

50

Por encima de cualquier otra consideración, una variedad mejorada para un carácter dado debe mantener su rendimiento o producción original. Teniendo en cuenta que, en general, los frutos partenocárpicos tienen un peso fresco que es la mitad o las dos terceras partes del de los frutos con semillas (Philouze, 1983), no se puede garantizar una producción de frutos partenocárpicos de buen rendimiento por los métodos tradicionales (Ho & Hewitt, 1986). En cambio, mediante la expresión del gen LFY en tomate se mantiene el peso medio del fruto (en torno a los 90 g) característico del cultivar p73 (Tabla 1).

55

Consideraciones adicionales

60

- La expresión constitutiva del gen LFY en plantas transgénicas de tomate conduce a dos tipos de efectos favorables: i) el cambio de arquitectura de la planta (de un crecimiento indeterminado se pasa a otro de tipo determinado); y ii) la formación de frutos partenocárpicos y con mayor calidad. Estos dos aspectos (cambio en la arquitectura de la planta, por un lado, y partenocarpia y calidad de los frutos, por otro) pueden conseguirse de forma separada transfiriendo el gen LFY bajo el control de promotores específicos (eg. la transformación con LFY bajo el control de un promotor específico de óvulos conduciría a frutos partenocárpicos y de mayor calidad sin que quede alterada la arquitectura de la planta).

65

ES 2 323 028 B2

- La invención aquí descrita es, en principio, independiente del genotipo. Cuando se introduce partenocarpia mediante la mejora tradicional, la reacción puede ser mejor en frutos grandes de tipo multilocular que en frutos pequeños con pocos lóculos (Ho & Hewitt, 1986). En cambio, la disponibilidad de métodos de transformación con otros cultivares de tomate permite introducir el gen *LFY* en cualquiera de ellos con el fin de lograr la partenocarpia en frutos de distintas formas y tamaños, tanto para el consumo en fresco como para la industria.
- La expresión del gen *LFY* puede tener el mismo efecto en otras especies (eg. sandía) en las que resulta relevante la obtención de frutos sin semillas y con mayor calidad organoléptica. Por tanto, el presente método debe extenderse a cualquier otra especie en la que se produzcan los efectos favorables descritos.

Las plantas transgénicas obtenidas no producen semillas viables -de hecho uno de los aspectos claves del método es que permite la obtención de frutos partenocárpicos (sin semillas) -y, por lo tanto, no pueden autofecundarse ni reproducirse entre ellas y dar una progenie transgénica. No se produce ni se reivindica por consiguiente variedad alguna.

Ejemplo 1

Obtención de plantas transgénicas de tomate con distintos niveles de expresión del transgén LFY

Teniendo en cuenta que la expresión de un gen implicado en el desarrollo floral podía afectar a caracteres del fruto y la arquitectura de la planta, elegimos el cultivar de tomate p73, no transgénico y de crecimiento indeterminado, como material vegetal de partida.

La transformación genética se llevó a cabo mediante un protocolo desarrollado por nosotros (Ellul *et al.*, 2001) que implica el cocultivo de explantes con *Agrobacterium tumefaciens*. En un vector de tipo pBIN 19 (Bevan, 1983), el gen *LFY* se puso bajo el control del promotor constitutivo p35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV; Brisson *et al.*, Nature, 310: 511, 1984). La construcción génica incluye también un gen marcador de resistencia a kanamicina (*nptII*) bajo control del promotor de la nopalina sintetasa (*nos*).

De los 60 transformantes primarios (TG1) se identificaron 30 plantas transgénicas diploides mediante citometría de flujo. Estas plantas se caracterizaron a nivel molecular mediante amplificación del DNA genómico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el gen marcador de selección (*nptII*) y para el gen *LFY*. Además, se realizaron los análisis moleculares pertinentes con el fin de detectar el número de copias insertadas (análisis Southern) y el nivel de expresión de los transgenes (análisis Northern) en plantas diploides resistentes a la kanamicina y PCR positivas.

Ejemplo 2

Modificación del patrón de crecimiento

Con el fin de estudiar el efecto del transgén *LFY* sobre el patrón de crecimiento se cultivaron plantas de la población original (p73), somaclones de p73 (plantas no transgénicas regeneradas en las mismas condiciones) y plantas transgénicas (TG1) que expresan el gen *LFY* a distintos niveles transcripcionales.

En las plantas testigo (p73) pudimos observar un crecimiento de tipo simpodial, característico del tomate. La primera etapa consta de una fase juvenil vegetativa en la que aparecen entre 10 y 11 fitómeros (Figs. 1 y 4). En este momento, el meristemo del tallo principal (SAM = *Shoot Apical Meristem*) experimenta la transición a un meristemo de inflorescencia o floral. En cambio, las plantas transgénicas sólo forman 3-4 fitómeros antes de producir la primera inflorescencia (Figs. 1 y 2). Este adelanto de la floración a nivel ontogénico se traduce también en un incremento de la frecuencia de plantas transgénicas que se determinan: 20%, 50% y 80% a las 8, 13 y 18 semanas de cultivo, respectivamente, en contraste con lo que ocurre en las plantas testigo (0%, 30% y 35% para los mismos periodos de cultivo) (Fig. 2). Una de las consecuencias de esta determinación precoz es la reducción de la altura de las plantas transgénicas que sólo alcanzan unos 80 cm cuando las testigo superan los 160 cm (Fig. 3).

Tras la aparición de esta primera inflorescencia, el desarrollo del tallo principal continúa mediante la elongación de un brote axilar, que de nuevo se determina para que un nuevo brote axilar forme la siguiente unidad simpodial, y así sucesivamente. Este patrón de crecimiento se reproducirá dando lugar a un tallo compuesto de varias unidades simpodiales constituidas por 2 o 3 fitómeros en la planta testigo. En cambio, en las plantas transgénicas lo que se observa es una reducción en el número de fitómeros (entre 1 y 2) en las siguientes unidades simpodiales (Figs. 1 y 2). Además, en el caso de ciertos genotipos, la expresión de *LFY* promueve la iniciación y el desarrollo floral en los meristemos vegetativos de los brotes axilares.

Ejemplo 3

Obtención de frutos de tomate p35S::LFY partenocárpicos

5 Los frutos del cultivar p73 son ligeramente achatados, aunque los hay también más redondos (Figs. 5 y 6). Son frutos de gran tamaño (calibre G y GG; > a 67 mm), multiloculares (media en torno a 4 lóculos) y presentan unos hombros de intensidad ligera es decir, son del tipo acostillado ligero o liso. Todos los frutos tienen semillas.

10 En las plantas *p35S::LFY*, la mayoría de los frutos (80%) muestra una forma distinta a la del testigo: son apuntillados (forma de corazón), tienen más carne y menos pulpa y, además, son partenocárpicos (Figs. 5 y 6). Algunos (15%) son ligeramente achatados y sin semillas. Los restantes (5%) son frutos ligeramente achatados con unas pocas semillas (entre 10-20) por fruto.

15 En ninguna de las plantas transgénicas de tomate de los cuatro genotipos seleccionados (9.1a, 37.2a, 42.1a y 45.3a) hemos podido observar semillas verdaderas (es decir, semillas con desarrollo normal, tamaño típico y viables). En el caso de las plantas transgénicas *35S::LFY* de genotipo 37.2a y 42.1a, todos los frutos muestran una forma apuntillada que se acompaña con una ausencia absoluta de semillas. Sólo aparecen los embriones abortados (visibles en la Fig. 6). En cambio, en los genotipos 9.1a y 45.3a, el 12% y 44% de los frutos, respectivamente, muestran una forma achatada y las mismas semillas pequeñas que indican la presencia de embriones abortados.

Ejemplo 4

Mejora de la calidad de los frutos p35S::LFY

25 El análisis de calidad en los frutos partenocárpicos de la plantas transgénicas que expresan el gen *LFY* (Tabla 1) indica un importante aumento en el contenido en sólidos solubles El análisis estadístico realizado con 4 genotipos que expresan el transgén *LFY*, 4 somaclones (plantas regeneradas no transgénicas) y cinco plantas del cultivar p73 (obtenidas por germinación de semillas) revela la ausencia de diferencias significativas entre las 2 poblaciones no transgénicas (3.83 y 3.63 °Brix, respectivamente) mientras en los frutos transgénicos se observa un *incremento del*
30 *60% en el contenido en sólidos solubles* (la media alcanza unos 6.12 °Brix).

35 Esta mejora del contenido en sólidos solubles se ve acompañada por un *incremento del 60% en los ácidos valorables*, ya que la media alcanza el 0.72% en los frutos procedentes de plantas que expresan el transgén *LFY*, mientras que en los frutos de somaclones (no transgénicos) y plantas procedentes de semillas los valores obtenidos son 0.42% y 0.49%, respectivamente.

40 (Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 323 028 B2

TABLA 1

Características de los frutos de tomate procedentes de plantas transgénicas 35S::LFY (TG), somaclones (SC = plantas regeneradas en cultivo *in vitro* pero no transgénicas) y plantas del cv p73 obtenidas a partir de semillas

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Genotipos	Nº frutos analizados	% frutos partenocárpicos	% frutos apuntillados	Peso medio del fruto (g)	° Brix	% ácidos valorables
TG 9.1 a	16	94%	88%	84,82	5,55	0,52
TG 37.2 a	12	100%	100%	79,91	6,22	0,79
TG 42.1 a	10	100%	100%	84,68	6,52	0,79
TG 45.3 a	18	94%	56%	100,35	6,18	0,79
(1) 35S::LFY	56	96%	82%	87,44^{n.s}	6,12^b	0,72^b
SC a	9	0%	0%	79,00	4,49	0,58
SC b	9	0%	0%	107,50	3,69	0,47
SC c	9	0%	0%	93,69	3,84	0,48
SC d	10	0%	0%	87,58	3,29	0,43
(2) Somaclones p73	37	0%	0%	91,94^{n.s}	3,83^a	0,49^a
P73 a	6	0%	0%	93,87	3,63	0,55
P73 b	3	0%	0%	90,65	3,73	0,44
P73 c	3	0%	0%	81,02	3,93	0,52
P73 d	4	0%	0%	96,54	3,25	0,44
P73 d	4	0%	0%	110,57	3,60	0,47
(3) Cultivar p73	20	0%	0%	94,53^{n.s}	3,63^a	0,42^a

55

(1) Frutos cosechados de plantas 35S::LFY: 4 transformantes primarios independientes (9.1 a, 37.2 a, 42.1 b, 45.3 a) y varias repeticiones por genotipo

60

(2) Frutos procedentes de 4 somaclones (plantas regeneradas en cultivo *in vitro*) de tomate (no transgénico) y varias repeticiones por somaclón

65

(3) Frutos procedentes de 5 plantas independientes de tomate obtenidas a partir de semillas del cultivar p73

ES 2 323 028 B2

Además, como puede verse en la Tabla 2, los frutos de las plantas transgénicas tienen un *mayor contenido en azúcares*, principalmente glucosa y fructosa. En los frutos de las plantas testigo los contenidos de glucosa y fructosa (mg/g de peso fresco) son 10.2 y 12.1, respectivamente, mientras que en las plantas transgénicas estos valores se duplican (21.6 y 26.8, respectivamente).

TABLA 2

Composición en azúcares (mg/g de peso fresco) en frutos de plantas testigo (cultivar p73) y frutos de plantas transgénicas p35s::LFY(9.1a, 37.2a, 42.1a, 45.3a)

Genotipos	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
TG 9.1a	0	19,6 ± 2,3	23,7 ± 3,1
TG 37.2a	0,3 ± 0,1	22,4 ± 2,2	26,1 ± 2,4
TG 42.1a	0,3 ± 0,0	22,9 ± 1,9	30,0 ± 1,1
TG 45.3a	0,2 ± 0,1	21,6 ± 3,2	27,3 ± 2,9
Media 35S::LFY	0,2 ± 0,1	21,6 ± 2,4	26,8 ± 2,4
<i>Testigo p73 a</i>	0	10,7 ± 0,5	12,9 ± 0,1
Testigo p73 b	0	9,9 ± 0,3	11,6 ± 0,2
Testigo p73 c	0	10,1 ± 0,6	11,7 ± 0,3
Media testigos p73	0	10,2 ± 0,5	12,1 ± 0,2

Por último, conviene resaltar que los frutos de las plantas transgénicas tienen un *mayor contenido de licopeno* (71.3 µg de peso fresco) que los frutos de las plantas testigo (57.2 µg de peso fresco). Este aspecto resulta de gran interés porque el licopeno es una sustancia que tiene propiedades antioxidantes. (Tabla 3).

TABLA 3

Composición en licopeno, β-caroteno y luteína (µg/g de peso fresco) en frutos de plantas testigo (cultivar p73) y frutos de plantas transgénicas p35s::LFY (9.1a, 37.2a, 42.1a, 45.3a)

Genotipos	Licopeno	β caroteno	Luteína
TG 9.1a	71,0 ± 6,2	3,9 ± 1,4	0,7 ± 0,1
TG 37.2a	67,3 ± 5,1	3,8 ± 2,0	0,4 ± 0,0
TG 42.1a	71,6 ± 6,0	5,5 ± 1,1	0,4 ± 0,1
TG 45.3a	75,3 ± 5,9	3,2 ± 1,2	0,6 ± 0,2
Media 35S::LFY	71,3 ± 5,8	4,1 ± 1,4	0,5 ± 0,1
<i>Testigo p73 a</i>	61,0 ± 4,6	5,0 ± 2,7	0,8 ± 0,1
Testigo p73 b	53,7 ± 5,2	4,5 ± 2,2	1,0 ± 0,1
Testigo p73 c	57,0 ± 5,9	4,7 ± 2,0	1,4 ± 0,2
Media testigos p73	57,2 ± 5,2	4,7 ± 2,3	1,1 ± 0,1

Descripción de las figuras

Figura 1: Efecto de la expresión del gen LFY (histogramas más oscuros) sobre el tiempo de floración en plantas transgénicas de tomate con respecto al control o testigo -cultivar p73- (histogramas más claros). El recuento del número de fitómeros se ha realizado en plantas de 18 semanas (Los valores expresan las medias \pm el error estándar de la media). Ordenadas: Número de fitómeros. Abcisas: Posición de fitómeros en la planta (hasta la primera inflorescencia, entre 1^a, y 2^a, ...).

Figura 2: Efecto de la expresión del gen LFY (histogramas más oscuros) sobre la determinación del meristemo vegetativo del tallo principal de las plantas transgénicas de tomate frente a plantas control (histogramas más claros). (Los valores expresan las medias \pm el error estándar de la media). Ordenadas: % de plantas determinadas; Abcisas: semanas de cultivo.

Figura 3: Efecto de la expresión del gen LFY (histogramas más oscuros) en relación con plantas control (histogramas más claros) sobre la altura de las plantas transgénicas de tomate cultivadas en invernadero. (Los valores expresan las medias \pm el error estándar de la media). Ordenadas: altura de la planta (cm); Abcisas: semanas de cultivo.

Figura 4: Dibujo explicativo de la arquitectura de una planta de tomate cv.p73 (no transgénica) y una planta transgénica que expresa la construcción *p35S::LFY*.

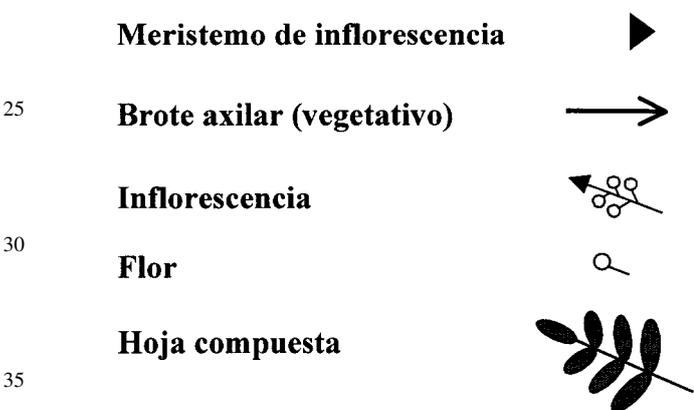


Figura 5: Morfología y anatomía de los frutos de tomate cortados transversalmente. Fruto testigo del cultivar p73 (5a) y fruto 35S::LFY partenocárpico y apuntillado (5b).

Figura 6: fruto 35S::LFY achatado y con pocas semillas (6a) y fruto 35S::LFY achatado y partenocárpico (6b).

Figura 7: Esquema de la construcción génica pBIN19 donde se inserta el gen LFY (SEQ ID NO: 1):

- Ori: origen de replicación.
- Kn^R: gen de resistencia a la kanamicina.
- LacZ: gen reportero que codifica para la β -galactosidasa.
- BamHI, SmaI, KpnI y SacI: enzimas de restricción.
- pNOS: promotor.
- nptII: marcador de resistencia a kanamicina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de plantas transgénicas de *Lycopersicon*, **caracterizadas** por poseer frutos con una composición media de sólidos solubles de 6.12 °Brix, que comprende:
- a) Insertar el gen *LFY* (SEQ ID NO: 1) de *Arabidopsis thaliana* en un vector que se introduce en un microorganismo hospedador
 - 10 b) Cocultivar explantes de cultivar de tomate no transgénicos con dicho microorganismo hospedador transformado
 - c) Identificar de los transformantes primarios TG1 cuáles son plantas transgénicas diploides
 - 15 d) Amplificar el ADN genómico de las plantas identificadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para al menos el gen *LFY* (SEQ ID NO: 1).
2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el vector donde se inserta el gen *LFY* (SEQ ID NO: 1) es una construcción génica denominada pBIN19.
- 20 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque dicha construcción génica incluye un promotor de control del gen *LFY* (SEQ ID NO: 1).
4. Procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el promotor consiste en el promotor constitutivo de p35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque la construcción génica comprende también un gen marcador de selección bajo el control de un promotor específico.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque el gen marcador de selección es el gen de resistencia a kanamicina (*nptII*) y su promotor específico es el de la nopalina sintetasa (*nos*).
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque el microorganismo hospedador es *Agrobacterium tumefaciens*.
- 35 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque la identificación de plantas transgénicas diploides de la etapa c) se realiza mediante citometría de flujo.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque la amplificación del ADN genómico de las plantas transgénicas que se lleva a cabo en la etapa d) incluye también el gen marcador de selección.
- 40 10. Plantas transgénicas de tomate que expresan el gen *LFY* (SEQ ID NO: 1) de *Arabidopsis thaliana* **caracterizadas** por poseer frutos con una composición media de sólidos solubles de 6.12 °Brix.
- 45 11. Plantas transgénicas según la reivindicación 10 **caracterizadas** porque los frutos presentan una composición media de ácidos valorables del 0.72%.
12. Plantas transgénicas según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 **caracterizadas** porque los frutos son partenocárpicos o sin semillas, en una proporción superior al 95%.
- 50 13. Plantas transgénicas según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 **caracterizadas** porque los frutos presentan un contenido medio en azúcares, particularmente glucosa y fructosa, de 21,6 y 26,8 mg/g de peso fresco respectivamente.
- 55 14. Plantas transgénicas según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 **caracterizadas** porque los frutos presentan un contenido medio de licopeno de 71,3 µg/g de peso fresco.
15. Plantas transgénicas según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 **caracterizadas** porque presentan además un porte compacto.
- 60 16. Plantas transgénicas según la reivindicación 15 **caracterizadas** porque presentan una altura media a las 18 semanas de crecimiento que no supera los 80 cm.

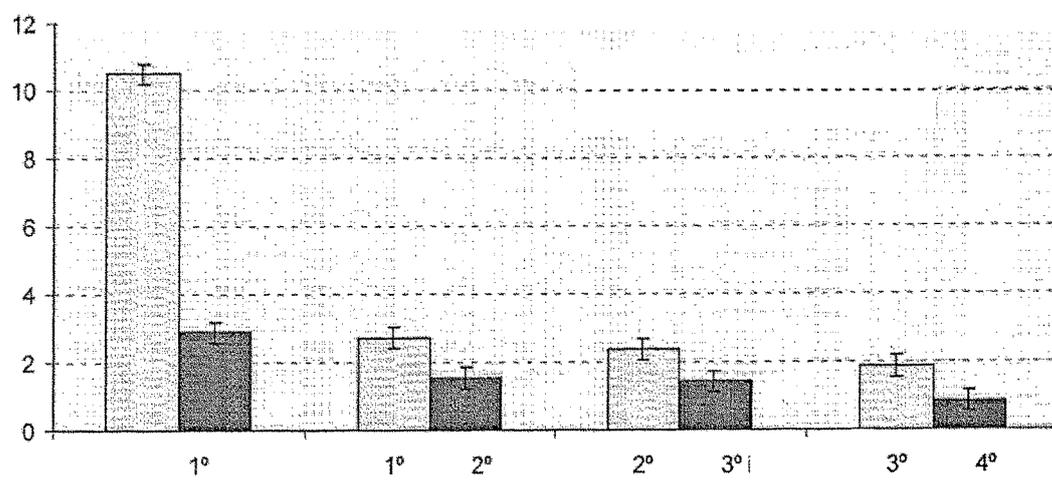


FIG. 1

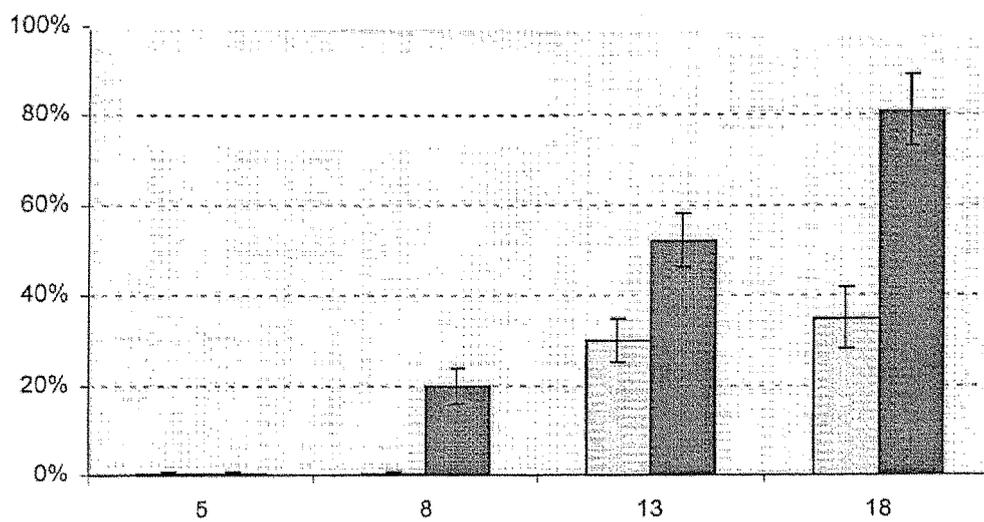


FIG. 2

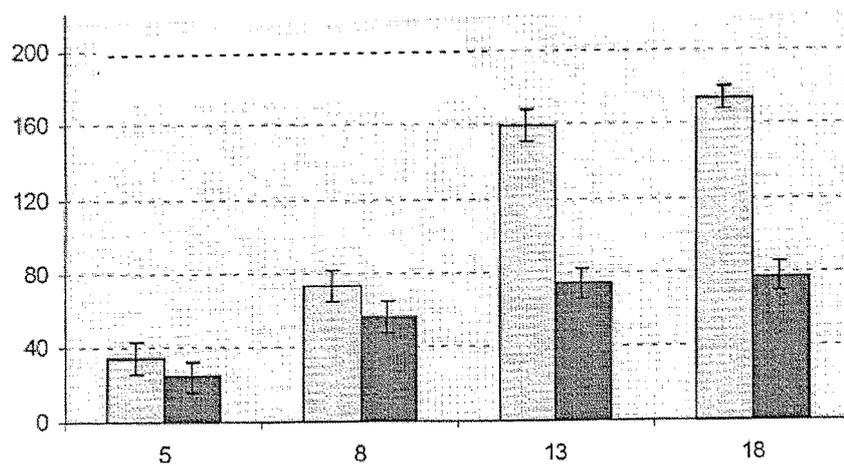


FIG. 3



FIG. 4



FIG. 5

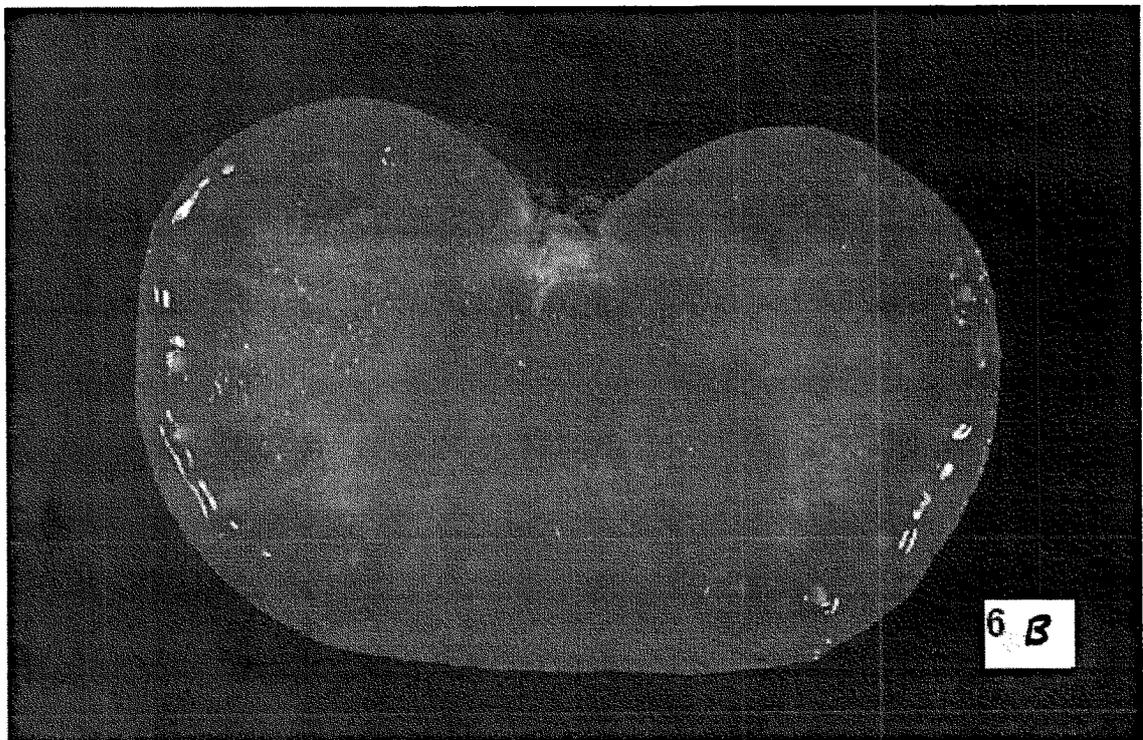


FIG. 6

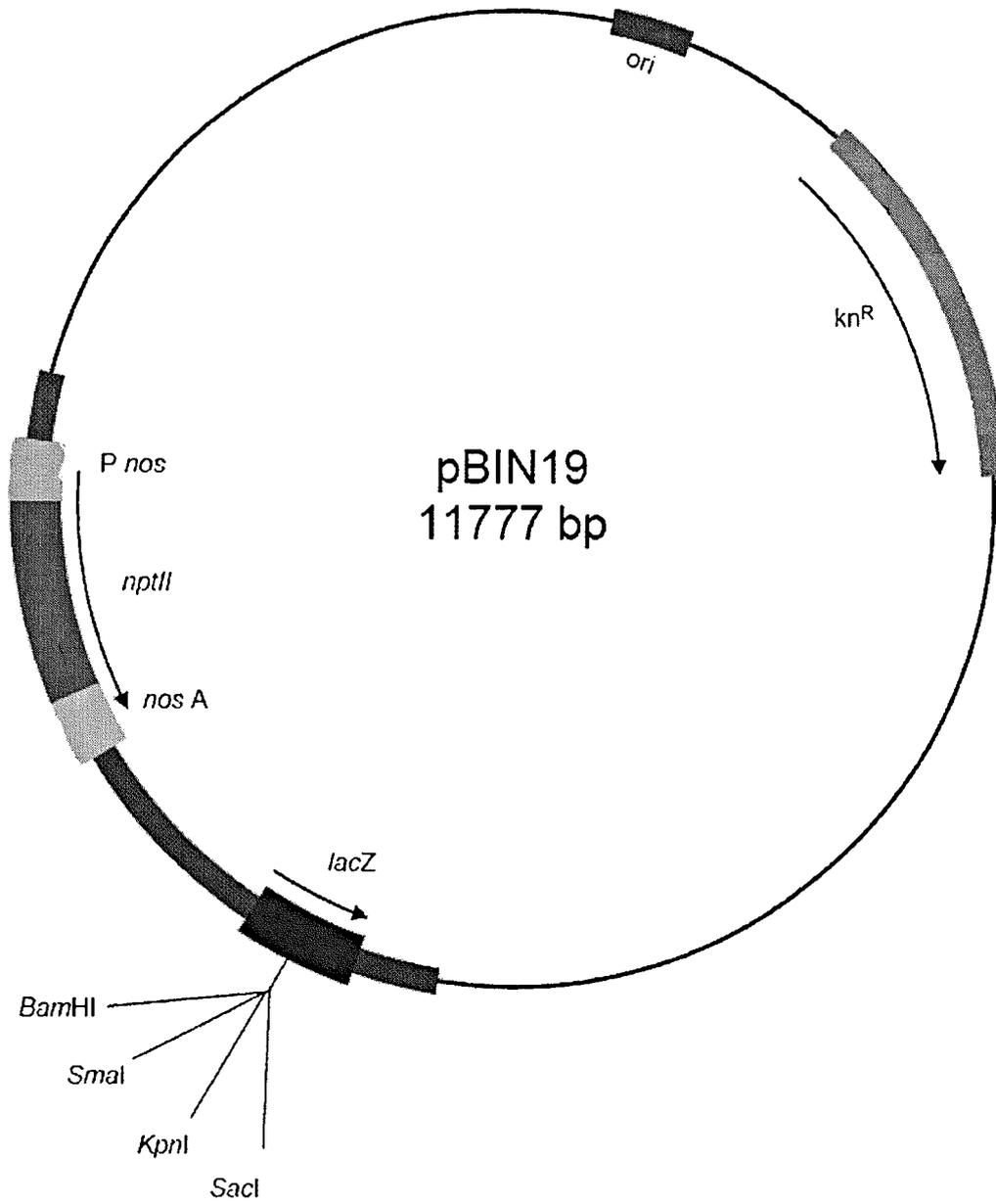


FIG. 7

ES 2 323 028 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA, INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TEC-
NOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA, CSIC Y UNIVERSIDAD DE ALMERÍA.

5

<120> MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE CULTIVARES DE TOMATE CON FRUTOS PARTENOCÁRPICOS
(SIN SEMILLAS) Y MAYOR CALIDAD ORGANOLÉPTICA

10

<130> CO-02459

<160> 1

15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

20

<211> 1263

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

25

<400> 1

atggatcctg aaggtttcac gagtggctta ttccggtgga acccaacgag agcattggtt	60
caagcaccac ctccggttcc acctccgctg cagcaacagc cggtgacacc gcagacggct	120
gcttttggga tgcgacttgg tggtttagag ggactattcg gtccatacgg tatacgtttc	180
tacacggcgg cgaagatagc ggagtttagt tttacggcga gcacgcttgt gggatgaag	240
gacgaggagc ttgaagagat gatgaatagt ctctctcata tctttcgttg ggagcttctt	300
gttggtgaac ggtacggtat caaagctgcc gttagagctg aacggagacg attgcaagaa	360
gaggaggaag aggaatcttc tagacgccgt catttgctac tctccgccgc tggtgattcc	420
ggtactcadc acgctcttga tgctctctcc caagaagggt tatctgagga accggtgcag	480
caacaagacc agactgatgc ggcggggaat aacggcggag gaggaagtgg ttactgggac	540
gcaggtcaag gaaagatgaa gaagcaacag cagcagagac ggagaaagaa accaatgctg	600
acgtcagtgga aaaccgacga agacgtcaac gaaggtgagg atgacgacgg gatggataac	660
ggcaacggag gtagtggttt ggggacagag agacagaggg agcatccgtt tatcgtaacg	720
gagcctgggg aagtggcacg tggcaaaaag aacggcttag attatctggt ccacttgtag	780
gaacaatgcc gtgagttcct tcttcaggtc cagacaattg ctaaagaccg tggcgaaaaa	840
tgccccacca aggtgacgaa ccaagtattc aggtacgcga agaaatcagg agcgagttac	900
ataaacaagc ctaaaatgcg aactacgtt cactgttacg ctctccactg cctagacgaa	960
gaagcttcaa atgctctcag aagagcgttt aaagaacgcg gtgagaacgt tggctcatgg	1020
cgtcaggctt gttacaagcc acttgtgaac atcgcttgtc gtcattggctg ggatatagac	1080
gccgtcttta acgctcatcc tcgtctctct atttggtatg ttccaacaaa gctgcgtcag	1140
ctttgccatt tggagcggaa caatgcgggt gctgcggctg cggctttagt tggcggatt	1200
agctgtaccg gatcgtcgac gtctggacgt ggtggatgcg gcggcgacga cttgcgtttc	1260
tag	1263



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 323 028

② Nº de solicitud: 200501603

③ Fecha de presentación de la solicitud: 23.06.2005

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 15/82** (2006.01)
A01H 5/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ELLUL P, et al. Expression of Arabidopsis APETALA1 in tomato reduces its vegetative cycle without affecting plant production. 2004. Molecular Breeding. Vol. 13, páginas 155-163. Materiales y métodos.	1-9
A	MAZZUCATO A, et al. The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. 1998. Development. Vol. 125, páginas 107-114.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

16.06.2009

Examinador

I.Rueda Molins

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.06.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 10 -15	SÍ
	Reivindicaciones 1-9	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ELLUL P, et al. Expression of Arabidopsis APETALA1 in tomato reduces its vegetative cycle without affecting plant production.	2004
D02	MAZZUCATO A, et al. The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development.	1998

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente divulga un procedimiento de obtención de plantas de tomate modificadas genéticamente (reivindicaciones 1-9) y plantas transgénicas de tomate que expresan el gen LFY (reivindicaciones 10-15).

El documento D01, que refleja el estado de la técnica más cercano, divulga un método para introducir un gen de Arabidopsis en plantas de tomate.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986)

Las reivindicaciones 1-9, de la solicitud de patente, reivindican un procedimiento de obtención de plantas transgénicas que comprende cuatro etapas: inserción del gen LFY de Arabidopsis thaliana en un vector que se introduce en un organismo hospedador, cocultivo de los explantos de tomate con dicho microorganismo, identificación de los transformantes primarios diploides y la amplificación del ADN.

El documento D01 divulga (en el apartado de materiales y métodos) un procedimiento para introducir el gen APETALA1 de Arabidopsis thaliana en plantas de tomate. Dicho procedimiento, comprende una serie de etapas que coinciden con las divulgadas en la solicitud de patente. La diferencia entre el procedimiento divulgado en el documento D01 y el divulgado en la solicitud de patente, reside en que el gen que se introduce en las plantas de tomate de la solicitud de patente, es el gen LFY. Dicha diferencia, no impediría que para el experto en la materia, resultara evidente el empleo del procedimiento divulgado en el documento D01 para la introducción del gen LFY. Por tanto, las reivindicaciones 1-9, presentarían novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.