

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 724**

51 Int. Cl.:

A01H 5/08 (2008.01)

A01H 6/82 (2008.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C07K 14/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2016 PCT/JP2016/073164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17022859**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2016 E 16833138 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2023 EP 3332633**

54 Título: **Planta que tiene un gen de ciclina F-box de tipo mutante**

30 Prioridad:

06.08.2015 JP 2015156140

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

03.11.2023

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF TSUKUBA (100.0%)
1-1-1, Tennodai
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8577, JP**

72 Inventor/es:

**EZURA, HIROSHI;
ARIIZUMI, TOHRU;
MASUDA, JUN-ICHIRO y
OKABE, YOSHIHIRO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 952 724 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

Planta que tiene un gen de ciclina F-box de tipo mutante

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una planta que tiene un gen de ciclina F-box mutante, y especialmente una planta que tiene un gen de ciclina F-box mutante que confiere partenocarpia y/o un alto contenido de azúcar al fruto.

10 Antecedentes de la técnica

En los últimos años, existe una demanda creciente de tomates y, en especial, se han vuelto populares los tomates con alto contenido de azúcar. Para lograr un alto contenido de azúcar en los tomates, se emplea ampliamente una carga de estrés hídrico (restricción de la cantidad de agua suministrada o absorbida por las tomatas) durante el cultivo. Existen varios métodos de cultivo, equipos y similares conocidos para lograr un alto contenido de azúcar en los tomates mediante la carga de estrés hídrico (p. ej., Documentos de patente 1 a 2). También se conocen el tratamiento con un agente para mejorar el contenido de azúcar (Documentos de patentes 3 a 5), el tratamiento con irradiación de luz roja una vez finalizado el período de luz (Documentos de patente 6) y similares como técnicas para lograr un alto contenido de azúcar en los tomates. Sin embargo, las técnicas convencionales para lograr un alto contenido de azúcar requieren tecnología de cultivo e instalaciones de cultivo especializadas y, por lo tanto, todavía hay muchos problemas en términos de eficiencia económica, eficiencia laboral y estabilidad. Se está a la espera del desarrollo de una nueva tecnología para conseguir un alto contenido de azúcar en los tomates con menos mano de obra y menos costes.

Mientras tanto, aunque los tomates son plantas autopolinizantes, se sabe que el cultivo del tomate en invernadero reduce las tasas de polinización y fructificación debido a la falta de viento y de insectos que ayuden a la polinización. Por lo tanto, se utilizan ampliamente métodos para promover la partenocarpia y el engorde del fruto mediante el tratamiento con hormonas vegetales de los racimos florales. Como alternativa, también se utilizan ampliamente métodos para promover la polinización mediante abejorros o vibradores. Sin embargo, el tratamiento con hormonas vegetales y el tratamiento para promover la polinización con vibradores requieren mucha mano de obra, lo que se traduce en una disminución significativa de la eficiencia de la mano de obra. Aunque la eficiencia laboral de un método que utiliza abejorros es buena, el método tiene el problema de provocar un aumento del coste y del esfuerzo para el control de la temperatura en una instalación en verano y en invierno, debido a la limitación del intervalo de temperatura para la actividad de los abejorros. Además, la reducción de la fertilidad del polen en verano e invierno dificulta la obtención de una producción de frutos estable a lo largo de un año en el caso de la fructificación mediante polinización/fertilización, lo que también es problemático. Por lo tanto, para realizar un cultivo estable con menores mano de obra y coste, reduciendo al mismo tiempo la influencia de factores medioambientales como los estacionales, existe una demanda de desarrollo de tecnología para inducir la partenocarpia en las tomatas con una eficiencia laboral mejorada.

Las técnicas relativamente nuevas para inducir la partenocarpia de las tomatas incluyen un método que utiliza un potenciador hormonal no vegetal de la fructificación (p. ej., Documento de patente 7) y un método para introducir un gen partenocárpico en las tomatas (Documentos de patente 8 a 9). Sin embargo, el método que utiliza un potenciador de la fructificación sigue teniendo problemas en términos de eficiencia laboral. Además, una variedad de tomate partenocárpico que se produce utilizando un gen partenocárpico convencional tiene problemas en términos de calidad del fruto debido al ablandamiento o similares. En vista de lo anterior, se está a la espera del desarrollo de una variedad de tomate que tenga partenocarpia y características de fruto preferibles.

Asimismo, se está a la espera del desarrollo de un método de inducción partenocárpica que permita una producción estable de frutos con ahorro de mano de obra y bajo coste no solo para las tomatas, sino también para muchas otras plantas de cultivo.

Listado de citas**55 Bibliografía de patentes**

- Documento de patente 1: Publicación de patente JP n.º 2012-100595 A
- Documento de patente 2: Publicación de patente JP n.º 2012-161289 A
- Documento de patente 3: Publicación internacional WO 2005/094557
- Documento de patente 4: Publicación internacional WO 2009/063806
- Documento de patente 5: Publicación internacional WO 2010/021330
- Documento de patente 6: Publicación de patente JP n.º 2012-65601 A
- Documento de patente 7: Publicación de patente JP n.º 2004-331507 A
- Documento de patente 8: Publicación internacional WO 99/21411
- Documento de patente 9: Publicación internacional WO 2009/005343

Sumario de la invención

Problema técnico

- 5 Es un objeto de la presente invención proporcionar una planta que tenga un contenido de azúcar mejorado en el fruto y un método para producirla. Es otro objeto de la presente invención proporcionar una planta partenocárpica y un método para producirla.

Solución al problema

- 10 Como resultado de estudios exhaustivos para resolver los problemas descritos anteriormente, los presentes inventores descubrieron que una mutación que altera la función del gen de ciclina F-box confiere partenocarpia y aumenta el contenido de azúcar en los frutos de plantas tales como el tomate. Esto ha llevado a la materialización de la presente invención.

- 15 Específicamente, la presente invención abarca lo siguiente.

- [1] Una tomatara partenocárpica que tiene un gen de ciclina F-box mutante que confiere partenocarpia al tomate y codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 95 % o mayor con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que comprende una sustitución de prolina en la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína ciclina F-box de la SEQ ID NO: 2 por glutamina.
- 20 [2] La tomatara de acuerdo con [1], en donde la tomatara tiene un contenido mejorado de azúcar en el fruto, que tiene un aumento estadísticamente significativo en comparación con una planta de tipo natural de la misma variedad o cepa que tiene el gen de ciclina F-box de tipo natural.
- 25 [3] La tomatara de acuerdo con [1] o [2], en donde el gen de ciclina F-box mutante codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
- [4] La tomatara de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en donde la tomatara es una semilla o un fruto.
- [5] Un método para producir una tomatara partenocárpica, que comprende introducir mediante mutagénesis específica de sitio o mutagénesis aleatoria una mutación nucleotídica en un gen de ciclina F-box de una tomatara para generar un gen de ciclina F-box mutante que confiera partenocarpia al tomate y codifique una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia del 95 % o mayor con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que comprenda una sustitución de prolina de la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína ciclina F-box de la SEQ ID NO: 2 por glutamina.
- 30 [6] El método de acuerdo con [5], en donde la mutación nucleotídica se introduce mediante mutagénesis específica de sitio.
- [7] El método de acuerdo con [6], en donde la tomatara tiene un contenido mejorado de azúcar en el fruto, que tiene un aumento estadísticamente significativo en comparación con una planta de tipo natural de la misma variedad o cepa que tiene el gen de ciclina F-box de tipo natural.
- [8] El método de acuerdo con [6] o [7], en donde el gen de ciclina F-box mutante codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
- 40 [9] Un gen de ciclina F-box mutante aislado, que confiere partenocarpia al tomate y codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 95 % o mayor con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y comprende una sustitución de prolina de la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 por glutamina.
- 45 [10] El gen de ciclina F-box mutante aislado de [9], que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

La presente descripción incluye las divulgaciones de la solicitud de patente japonesa n.º 2015-156140, con respecto a las cuales la presente solicitud reivindica la prioridad.

50 Efectos ventajosos de la invención

La presente invención facilita la producción de una planta que tiene partenocarpia y/o un contenido de azúcar mejorado del fruto.

55 Breve descripción de los dibujos

- [Figura 1] La figura 1 es una fotografía que muestra la morfología de las hojas de tomataras de tipo natural y mutantes. Barra = 5 cm.
- [Figura 2] La figura 2 muestra la longitud del tallo principal para tomataras de tipo natural y mutantes.
- 60 [Figura 3] La figura 3 muestra el valor SPAD de hojas para tomataras de tipo natural y mutantes.
- [Figura 4] La figura 4 muestra el espesor de la pulpa del fruto (mm) para tomataras de tipo natural y mutantes.
- [Figura 5] La figura 5 muestra el valor Brix (índice de contenido de azúcar) de frutos para tomataras de tipo natural y mutantes.
- [Figura 6] La figura 6 muestra la productividad de las semillas para tomataras de tipo natural y mutantes.
- 65 [Figura 7] La figura 7 muestra esquemáticamente el mapeo del genoma del gen causal en la tomatara mutante.
- [Figura 8] La figura 8 muestra los resultados del genotipado usando marcadores dCAPS. En la figura, M indica un

marcador de peso molecular de ADN (Gene Ladder Wide 1).

[Figura 9] La figura 9 muestra las secuencias de nucleótidos que comprenden los sitios correspondientes a la mutación y sus regiones circundantes en varias variedades de tomate.

[Figura 10] La figura 10 muestra los pesos de los frutos (g/fruto) y los valores Brix (%) de frutos rojos maduros obtenidos a través del tratamiento de polinización de tomatas de tipo natural y mutantes. Se probó una diferencia significativa con la prueba HSD de Tukey-Kramer ($p < 0,01$). La diferencia entre las letras sobre barras indica la presencia de una diferencia significativa ($p < 0,01$).

[Figura 11] La figura 11 es una fotografía que muestra la influencia de la mutación del gen de ciclina F-box en el crecimiento. La cepa E8986 en los paneles superiores presentó una morfología foliar anómala (anomalía relativamente débil), mientras que la cepa W283 en los paneles centrales mostró una anomalía morfológica foliar más fuerte en comparación con la cepa E8986. La morfología foliar de tipo natural que se muestra en los paneles inferiores es normal.

Descripción de las realizaciones

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con detalle. Cualquier aspecto, realización y ejemplo de la presente divulgación que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención y se proporciona meramente con fines ilustrativos.

La presente invención se refiere a una planta que tiene un gen que codifica una proteína ciclina F-box mutante, que tiene una mutación nucleotídica que provoca una sustitución de aminoácido no conservativa y confiere partenocarpia y/o un alto contenido de azúcar al fruto; y un método para producirla. En una realización, la presente invención se refiere a una planta que tiene un gen de ciclina F-box mutante que contiene una mutación que modifica la función del gen que confiere partenocarpia; y un método para producirla. En el contexto de la presente invención, el gen de ciclina F-box "mutante" se refiere a un gen que contiene una mutación nucleotídica que provoca alteraciones en la función del gen en la secuencia de nucleótidos del gen de ciclina F-box de tipo natural. La planta de acuerdo con la presente invención tiene el gen de ciclina F-box mutante que contiene una mutación que modifica la función del gen que proporciona partenocarpia, lo que permite que la planta adquiera capacidad partenocárpica. Además, la planta de la presente invención tiene preferentemente un contenido de azúcar mejorado en el fruto en comparación con una planta que tiene el gen de ciclina F-box de tipo natural debido al gen de ciclina F-box mutante. La mejora del contenido de azúcar en el fruto se muestra incluso en los frutos polinizados y se muestra de manera particularmente significativa en los frutos partenocárpicos.

En el contexto de la presente invención, el término "partenocarpia" se refiere a la producción de frutos sin semillas sin polinización y fertilización en una planta, que presentan el agrandamiento del ovario, receptáculos o similares sin formación de semillas. En el contexto de la presente invención, los términos "partenocárpica" y "capacidad partenocárpica" se refieren a la propiedad y la capacidad de una planta para provocar la partenocarpia sin necesidad de un tratamiento de inducción partenocárpica artificial, tal como el tratamiento con hormonas vegetales o una determinada estimulación física, respectivamente.

Las plantas utilizadas en la presente divulgación normalmente son angiospermas y preferentemente plantas cultivadas cuyos frutos son comestibles. Algunos ejemplos de tales plantas incluyen, pero sin limitación, plantas pertenecientes a las solanáceas tales como el tomate (*Solanum lycopersicum*), berenjena (*Solanum melongena*) y pimiento (*Capsicum annuum* var. *grossum*); y cucurbitáceas tales como, p. ej., pepino (*Cucumis sativus* L.), melón (*Cucumis melo* L.), sandía (*Citrullus lanatus*), calabaza (*Cucurbita*), y melón oriental (*Cucumis melo* var. *makuwa*). Preferentemente, las plantas utilizadas en la presente divulgación no son partenocárpicas o tienen niveles muy bajos de partenocarpia en el entorno natural.

Una planta particularmente preferida es el tomate (tomatera).

En la presente invención puede utilizarse cualquier tomate. Sin embargo, los ejemplos más preferidos de tomates incluyen, pero sin limitación, cepas/variedades de tomate o sus derivados pertenecientes a *Solanum lycopersicum*, *Solanum cerasiforme* (también conocida como *Lycopersicon cerasiforme*), *Solanum pimpinellifolium* (también conocida como *Lycopersicon pimpinellifolium*), *Solanum cheesmanii* (también conocida como *Lycopersicon cheesmanii*), *Solanum parviflorum* (también conocida como *Lycopersicon parviflorum*), *Solanum chmielewskii* (también conocida como *Lycopersicon chmielewskii*), *Solanum hirsutum* (también conocida como *Lycopersicon hirsutum*), *Solanum pennellii* (también conocida como *Solanum Lycopersicon pennellii*), *Solanum peruvianum* (también conocida como *Solanum pennellii* o *Lycopersicon peruvianum*), *Solanum chilense* (también conocida como *Lycopersicon chilense*), *Solanum lycopersicoides*, *Solanum habrochaites* y similares. Como un ejemplo de tomate, la variedad de tomate tipo natural Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) (Scott JW, Harbaugh BK (1989) Micro-Tom A miniature dwarf tomato, *Florida Agr. Expt. Sta. Circ.* 370, pág. 1-6) está disponible en el mercado, y también estará disponible en Tomato Genetics Resource Center (TGR) (EE. UU.) con el número de acceso LA391 1. La variedad de tomate de tipo natural Micro-Tom es una planta enana (de aproximadamente de 10 a 20 cm de longitud) con hojas y frutos pequeños, y también se puede cruzar con una variedad de tomate convencional. Se ha determinado la secuencia del genoma completo para la variedad de tomate de tipo natural Micro-Tom (Kobayashi M, *et al.*, (2014) *Plant Cell Physiol.* Febrero de 2014; 55(2): 445-454).

El término "derivada" utilizado en el presente documento se refiere a una planta de la descendencia que se obtiene cruzando una planta progenitora con una cepa/variedad vegetal diferente al menos una vez o mediante mutagénesis o introducción de mutaciones en una planta progenitora.

5 El gen de ciclina F-box es un gen que codifica una proteína ciclina F-box (también conocida como "proteína F-box de tipo ciclina") que es una de las proteínas de la familia de las proteínas F-box (un grupo de proteínas cada una de las cuales tiene un dominio denominado "región F-box") que participa en el reconocimiento y la degradación de determinadas proteínas. Los genes de ciclina F-box se han identificado en varias plantas. Por ejemplo, los ejemplos de la secuencia de nucleótidos del gen de ciclina F-box del tomate y la secuencia de aminoácidos codificada por la
10 secuencia de nucleótidos se ven en los números de acceso XM_004229918 y XP_004229966 de la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, EE. UU.). La secuencia de nucleótidos (secuencia CDS) del gen de ciclina F-box de tipo natural del tomate y la secuencia de aminoácidos de la proteína ciclina F-box de tipo natural del tomate codificada por la secuencia de nucleótidos se exponen en la SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Además, algunos ejemplos de la secuencia de nucleótidos del gen de ciclina F-box y la secuencia de aminoácidos
15 codificada por la secuencia de nucleótidos de otras especies vegetales son los siguientes, con números de acceso del NCBI: naranja dulce (XM_006491151 y XP_006491214, XM_006491152 y XP_006491215, XM_006491153 y XP_006491216), manzana (XM_008377812 y XP_008376034, XM_008377813 y XP_008376035), pera china (XM_009378963 y XP_009377238), uva (XM_002276408 y XP_002276444, XM_010663560 y XP_010661862, XM_010663561 y XP_010661863, XM_010663562 y XP_010661864, y XM_010663563 y XP_010661865), pepino (XM_004133777 y XP_004133825, XM_011652398 y XP_011650700), y melón (XM_008439705 y XP_008437927, XP_008439706 y XP_008437928, y XM_008439707 y XP_008437929). Otros genes homólogos derivados de plantas (homólogos) del gen de ciclina F-box de tipo natural del tomate que comprenden la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 también están incluidos en el alcance del gen de ciclina F-box. Además, la "secuencia CDS" del gen de ciclina F-box significa la secuencia de nucleótidos de la región codificante de la proteína ciclina F-box desde el
25 codón de iniciación hasta el codón de terminación.

Preferentemente, el gen de ciclina F-box mutante que comprende una mutación que altera la función del gen que confiere partenocarpia es un gen de ciclina F-box endógeno en el genoma de la planta, en el que se ha introducido una mutación que altera la función del gen que confiere partenocarpia.

30 El término "gen" utilizado en el presente documento abarca ADN y ARN (p. ej., ARNm). En el contexto de la presente invención, un gen puede consistir en una secuencia que codifica una proteína (que varía del codón de iniciación hasta el codón de terminación) y puede comprender además la región 5' no traducida, incluido el sitio de iniciación de la traducción, incluyendo la región 3' no traducida la señal de poliadenilación y/o la región reguladora degradable de
35 ARN, o similares.

En el contexto de la presente invención, una mutación que altera la función del gen que confiere partenocarpia en el gen de ciclina F-box mutante significa una mutación nucleotídica que produce partenocarpia como resultado de la alteración funcional del gen de ciclina F-box. De manera más específica, la alteración funcional del gen de ciclina F-box significa una alteración funcional (p. ej., un cambio en la conformación, actividad o propiedades de la proteína tales como la degradabilidad) de la proteína ciclina F-box codificada por el gen de ciclina F-box.

Una mutación que altera la función de un gen que confiere partenocarpia, que está presente en el gen de ciclina F-box mutante, puede ser, por ejemplo, una mutación nucleotídica que provoca la delección, sustitución (preferentemente sustitución no conservativa), inserción o adición de 1 a 50, preferentemente de 1 a 40 y más preferentemente de 1 a 10, p. ej., 1 a 5 restos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína ciclina F-box de tipo natural siempre que confiera partenocarpia.

Un ejemplo de un gen de ciclina F-box mutante utilizado en la presente invención que confiere partenocarpia es un gen de ciclina F-box que comprende, como mutación que altera la función de un gen que confiere partenocarpia, una mutación nucleotídica que provoca una sustitución no conservativa de aminoácido prolina en la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 (la secuencia de aminoácidos de la proteína ciclina F-box de tipo natural del tomate) en la proteína ciclina F-box. En otras palabras, este gen de ciclina F-box mutante codifica una proteína de ciclina F-box que tiene una sustitución no conservativa de aminoácido prolina en la
50 posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. La sustitución no conservativa de aminoácido prolina significa una sustitución de prolina por un aminoácido que tiene propiedades diferentes a las de la prolina. Específicamente, tal sustitución abarca una sustitución de prolina (aminoácido hidrófobo, no polar) por un aminoácido polar no cargado (serina, treonina, glutamina, asparagina o cisteína), y aminoácido aromático (fenilalanina, tirosina o triptófano), un aminoácido ácido (carga polar; ácido glutámico o ácido aspártico) o un aminoácido básico (carga polar; lisina, arginina o histidina). Como alternativa, la sustitución abarca una sustitución de prolina (aminoácido hidrófobo, no polar) por un aminoácido polar o un aminoácido hidrófilo (serina, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, triptófano, cisteína, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico o ácido glutámico). En la invención, una sustitución de aminoácido prolina no conservativa es una sustitución de prolina por glutamina. Una mutación nucleotídica que provoca una sustitución de prolina por glutamina es, por ejemplo, una mutación de
65 cualquiera de los codones CCT, CCC, CCA y CCG al codón CAA o CAG.

En el contexto de la presente invención, la expresión "prolina en la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2" se refiere a prolina en una secuencia de aminoácidos arbitraria (una secuencia de aminoácidos de cualquier proteína ciclina F-box) alineada con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que dicha prolina está alineada con la prolina en la posición 398 de la SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, la "prolina en la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2" puede ser prolina en la posición 398 o prolina en una posición distinta de la posición 398 en una secuencia de aminoácidos de cualquier proteína ciclina F-box que está alineada con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, en la proteína ciclina F-box que tiene una delección de un aminoácido cerca del extremo N-terminal, la prolina se encuentra en la posición 397, pero puede especificarse como "prolina en la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2", siempre que la prolina esté alineada con la prolina en la posición 398 de la SEQ ID NO: 2. En la presente invención, la alineación entre la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos de cualquier proteína ciclina F-box puede tener un hueco y debe hacerse de modo que las diferencias entre las secuencias (p. ej., inserción, delección, sustitución o adición) se minimizan y la alineación alcanza el máximo nivel de coincidencia. Expresiones similares tales como "(nucleótido) en la posición Y definida basándose en la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: X" y "(aminoácido) en la posición Y definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: X" debe entenderse de manera similar.

El gen de ciclina F-box mutante descrito anteriormente que confiere partenocarpia puede tener el 80 % o más, preferentemente el 90 % o más, más preferentemente el 95 % o más, todavía más preferentemente el 98 % o más y de manera particularmente preferida el 99 % o más, p. ej., el 99,5 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 y codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución no conservativa de aminoácido prolina en la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. Esta sustitución no conservativa de aminoácido prolina es preferentemente una sustitución de prolina por un aminoácido polar no cargado (serina, treonina, glutamina, asparagina o cisteína), y aminoácido aromático (fenilalanina, tirosina o triptófano), un aminoácido ácido (ácido glutámico o ácido aspártico) o un aminoácido básico (lisina, arginina o histidina); más preferentemente una sustitución de prolina por un aminoácido polar o un aminoácido hidrófilo (serina, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, triptófano, cisteína, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico o ácido glutámico); todavía más preferentemente una sustitución de prolina por un aminoácido polar no cargado (serina, treonina, glutamina, asparagina o cisteína); y de manera particularmente preferida una sustitución de prolina por glutamina. El gen de ciclina F-box mutante descrito anteriormente puede ser, pero sin limitación, un mutante del gen de ciclina F-box de tipo natural de preferentemente una planta perteneciente a las *Solanaceae* o *Cucurbitaceae* y, más preferentemente, tomate. En particular, el gen de ciclina F-box mutante descrito anteriormente puede codificar la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 es una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de prolina en la posición 398 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 (proteína ciclina F-box de tomate de tipo natural) por glutamina. La presente invención también proporciona tal gen de ciclina F-box mutante que confiere partenocarpia.

El gen de ciclina F-box mutante puede ser un gen que codifica una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 mediante delección, sustitución, inserción o adición de 1 a 50, preferentemente de 1 a 40 y más preferentemente de 1 a 10, p. ej., de 1 a 5 restos de aminoácido siempre que codifique una proteína ciclina F-box mutante que confiera partenocarpia. Este gen de ciclina F-box mutante contiene una sustitución no conservativa de aminoácido prolina en la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, preferentemente por glutamina.

Siempre que el gen de ciclina F-box mutante codifique una proteína ciclina F-box mutante que confiera partenocarpia, el gen mutante también puede comprender: (i) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 3; o (ii) una secuencia de nucleótidos que tenga el 70 % o más, preferentemente el 80 % o más, más preferentemente el 90 % o más, más preferentemente el 95 % o más, y particularmente preferentemente el 98 % o más, p. ej., el 99 % o más o el 99,5 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 y que comprende una mutación del codón CCA (que codifica prolina) en las posiciones 1192 a 1194 definidas basándose en la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 al codón CAA o CAG (que codifica glutamina). Tal mutación puede ser, por ejemplo, una sustitución de citosina (C) en la posición 1193 definida basándose en la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 del gen de ciclina F-box por adenina (A). El gen de ciclina F-box mutante puede comprender la secuencia de nucleótidos descrita anteriormente como una secuencia codificante de proteína (desde el codón de iniciación hasta el codón de terminación).

En esta descripción, identidad de secuencia (%) con una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos específica significa identidad de secuencia (%) con la longitud completa de la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos específica.

La planta de acuerdo con la presente invención es preferentemente homocigótica para el gen de ciclina F-box mutante que confiere la partenocarpia. El gen de ciclina F-box mutante que confiere la partenocarpia de acuerdo con la presente invención se hereda recesivamente. También se prefiere que la planta de acuerdo con la presente invención, que tiene el gen mutante ciclina F-box que confiere partenocarpia, no tenga un gen de ciclina F-box de tipo natural en un locus

que no sea el locus del gen de ciclina F-box mutante, en el genoma.

La planta de acuerdo con la presente invención, que tiene el gen mutante ciclina F-box que confiere partenocarpia, es partenocárpica. Es decir, en esa planta, incluso si no se produce la polinización y la fertilización y no se realiza un tratamiento de inducción partenocárpica artificial, tal como un tratamiento con hormonas vegetales, se produce la fructificación y el agrandamiento de los frutos. Por tanto, la presente invención proporciona un método para producir una planta partenocárpica que comprende la introducción de una mutación que altera la función del gen que confiere partenocarpia, por ejemplo, una mutación nucleotídica que provoca una sustitución no conservativa de aminoácido prolina en la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 en la proteína ciclina F-box, en el gen de ciclina F-box (normalmente, un gen de ciclina F-box endógeno) de una planta. La sustitución no conservativa de aminoácido prolina es como se ha descrito anteriormente, y es particularmente preferible una sustitución de prolina por glutamina.

La mutación que altera la función del gen que confiere la partenocarpia se puede introducir en el gen de ciclina F-box en una planta mediante métodos convencionales. Por ejemplo, para introducir la mutación descrita anteriormente en el gen de ciclina F-box, se pueden utilizar métodos de mutagénesis específica de sitio o similares tales como mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (ODM, *Oligonucleotide-Directed Mutagenesis*) y mutagénesis mediada por ZFN. La mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (ODM) provoca una mutación de interés en el genoma a través del mecanismo de reparación de emparejamientos incorrectos celulares mediante la introducción de un oligonucleótido corto que comprende una mutación de interés en una secuencia homóloga a un gen diana (gen de ciclina F-box) en las células vegetales. La mutagénesis mediada por ZFN emplea nucleasa con dedos de zinc (ZFN, *Zinc Finger Nuclease*) y un oligonucleótido corto que comprende una mutación de interés en una secuencia homóloga a un gen diana. Como alternativa, también es posible introducir la mutación descrita anteriormente en el gen de ciclina F-box en una planta mediante recombinación homóloga introduciendo el gen de ciclina F-box mutante o su fragmento de ácido nucleico que contiene el sitio de la mutación, como molde de ADN, en células vegetales. La mutación puede introducirse mediante técnicas de mutagénesis aleatoria. Por ejemplo, la mutagénesis se puede realizar en el genoma de una planta mediante el tratamiento con mutágenos químicos o radiación tal como rayos gamma, rayos X, neutrones, rayos beta, rayos ultravioleta, haces de iones y sincrotrón. Los ejemplos de mutágenos químicos incluyen, pero sin limitación, metanosulfonato de etilo (EMS), etilénimina (EI), metil nitrosourea (MNU), etil nitrosourea (ENU) y azida de sodio. Por ejemplo, la mutagénesis se puede realizar sumergiendo las semillas en una solución de metanosulfonato de etilo (EMS) durante un cierto período de tiempo para el tratamiento (mutagénesis con EMS). Se puede usar una pluralidad de métodos de mutagénesis aleatoria combinados. Se pueden emplear el método de los bigotes, método de pistola de partículas, método de electroporación, método de polietilenglicol (PEG), método de microinyección, o similar, para introducir un oligonucleótido o un fragmento de ácido nucleico en células vegetales.

También es posible introducir la mutación descrita anteriormente en una planta de la descendencia cruzando una planta mutante que tenga el gen de ciclina F-box mutante que confiere partenocarpia en el genoma con un individuo vegetal diferente. Preferentemente, las plantas de la descendencia obtenidas se examinan para determinar la presencia o ausencia del gen de ciclina F-box mutante que confiere partenocarpia y se seleccionan los individuos vegetales que tienen el gen de ciclina F-box mutante.

El hecho de que la planta de acuerdo con la presente invención sea o no partenocárpica puede determinarse mediante métodos convencionales. Por ejemplo, cuando los individuos vegetales se cultivan y se someten a un tratamiento de emasculación antes de la floración para evitar la polinización, la ausencia de fructificación (formación de frutos) durante el cultivo posterior indica que la planta no es partenocárpica, y la presencia de fructificación indica que la planta es partenocárpica. El tratamiento de emasculación es un tratamiento para eliminar la función masculina de las flores con el fin de evitar la autopolinización. Los ejemplos del tratamiento de emasculación incluyen la eliminación de los estambres de las yemas, un tratamiento térmico para provocar una pérdida de la función de los pólenes, y similares. La planta de acuerdo con la presente invención que tiene el gen de ciclina F-box mutante tiene, pero sin limitación, una tasa partenocárpica de preferentemente el 30 % o mayor, más preferentemente del 50 % o mayor, y aún más preferentemente del 60 % o mayor. En el contexto de la presente invención, la tasa partenocárpica se calcula como la proporción (%) del número fructificaciones (es decir, el número de frutos) con respecto al número de flores emasculadas dentro del mismo individuo o cepa. De acuerdo con este método, es posible conferir partenocarpia a las plantas de una manera más fácil. Es posible modificar una planta de modo que la planta se vuelva partenocárpica o aumentar el nivel de partenocarpia de la planta confiriendo partenocarpia a la planta.

La planta de acuerdo con la presente invención puede adquirir la capacidad de producir frutos que tienen un contenido de azúcar mejorado debido a la mutación descrita anteriormente en el gen de ciclina F-box (o el gen de ciclina F-box mutante). Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para producir una planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto, que comprende la introducción de una mutación que altera la función del gen que confiere partenocarpia, por ejemplo, una mutación nucleotídica que provoca una sustitución no conservativa de aminoácido prolina en la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 en la proteína ciclina F-box, en el gen de ciclina F-box de una planta. Esta sustitución no conservativa de aminoácido prolina es como se ha descrito anteriormente, y es particularmente preferible una sustitución de prolina por glutamina. La planta preferida es una planta cuyos frutos son comestibles. La planta pertenece preferentemente a las *Solanaceae* o *Cucurbitaceae* y es particularmente preferentemente tomate. La mutación que altera la función del

gen que confiere partenocarpia es como se ha descrito anteriormente.

La expresión "que tiene un contenido mejorado de azúcar en el fruto" con respecto a la planta de acuerdo con la presente invención significa que el contenido de azúcar en los frutos producidos por la planta de acuerdo con la presente invención tiene un aumento estadísticamente significativo en comparación con la planta de tipo natural de la misma variedad o cepa que tiene el gen de ciclina F-box de tipo natural (es decir, que no tiene una mutación que altera la función del gen que confiere partenocarpia). La expresión "planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto" se refiere a una planta que tiene la capacidad de producir frutos que tienen un contenido de azúcar mejorado sin un tratamiento especial para lograr un alto contenido de azúcar. Dicha planta no solo incluye una planta que acaba de producir frutos con contenido de azúcar mejorado, sino también una planta que dio o dará frutos con un contenido de azúcar mejorado o una parte de la misma (p. ej., semillas, plántulas o frutos). Los frutos que tienen contenido de azúcar mejorado abarcan frutos partenocárpicos, y preferentemente abarcan tanto frutos con semillas (frutos producidos mediante tratamiento de polinización; también denominados frutos polinizados) y frutos partenocárpicos. Los frutos partenocárpicos también muestran preferentemente mayores niveles de mejora en el contenido de azúcar que los frutos con semillas. Se puede aumentar el contenido de azúcar en frutos partenocárpicos o frutos con semillas, pero sin limitación, por ejemplo, 1,2 veces o más, preferentemente 1,5 veces o más, y más preferentemente 1,8 veces o más, en comparación con los frutos de tipo natural. El contenido de azúcar de los frutos se puede medir mediante métodos convencionales. Sin embargo, en la presente invención, se puede utilizar el valor Brix (%) del zumo de los frutos como indicador del contenido de azúcar. El valor Brix se puede medir mediante métodos convencionales y generalmente se mide usando un medidor de contenido de azúcar (por ejemplo, medidor de contenido de azúcar portátil BX-1, Kyoto Electronics Manufacturing Co., Ltd., Japón; o refractómetro portátil N-20E, ATAGO, Japón). Los frutos para los que se mide el contenido de azúcar son frutos maduros, tales como los frutos rojos maduros en el caso del

tomate. Según se informa, el contenido promedio de azúcar (valor Brix) de los tomates típicos producidos en Japón (excluidos los tomates afrutados que tienen un alto contenido de azúcar) es de aproximadamente el 5 %. De acuerdo con el presente método, es posible preparar fácilmente una planta capaz de producir frutos con un alto contenido de azúcar sin realizar tratamientos para lograr un alto contenido de azúcar tales como la sobrecarga.

Una planta partenocárpica obtenida mediante la introducción de una mutación que altera la función del gen que confiere partenocarpia, por ejemplo, una mutación nucleotídica que provoca una sustitución no conservativa de aminoácido prolina en la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 en la proteína ciclina F-box, en el gen de ciclina F-box de una planta; y las plantas de la descendencia de la misma que mantienen la mutación están incluidas en el alcance de la planta partenocárpica de acuerdo con la presente divulgación.

La planta de acuerdo con la presente invención, que tiene la mutación descrita anteriormente en el gen de ciclina F-box (gen de ciclina F-box mutante que confiere la partenocarpia), también puede tener una variedad de cambios en la morfología o características de crecimiento, en comparación con la planta de tipo natural. Por ejemplo, la planta de acuerdo con la presente invención puede tener cambios en las hojas o en los frutos (cambios en la morfología de la hoja, el color de la hoja, morfología del fruto, etc.). Por ejemplo, a diferencia de las hojas de las tomateras de tipo natural comunes que comprenden una pluralidad de folíolos que tienen bordes dentados (incisos), la tomatara de acuerdo con la presente invención, que es una planta mutante de la tomatara de tipo natural, desarrolla preferentemente hojas que tienen bordes dentados más débiles (reducción de la profundidad y el número de dientes de la hoja), folíolos fusionados, mayor verdor de las hojas en comparación con la planta de tipo natural, o similar (véanse las figuras 1 y 3). El verdor de la hoja se puede estimar como el valor SPAD de la hoja (densidad óptica de la clorofila). El valor SPAD se puede calcular para una muestra mediante métodos convencionales basados en una diferencia de densidad óptica entre la región roja que es absorbida por la clorofila y la región infrarroja que apenas es absorbida por los pigmentos. El valor SPAD se puede medir mediante un medidor de SPAD disponible en el mercado (medidor de clorofila) de forma no destructiva. En la planta de acuerdo con la presente invención, el verdor de la hoja aumenta en comparación con las plantas que no tienen la mutación descrita anteriormente los mismos días después de la siembra. Específicamente, el valor SPAD en la planta de acuerdo con la presente invención puede aumentarse en, pero sin limitación, preferentemente un 10 % o más, y más preferentemente un 20 % o más.

Además, la planta de acuerdo con la presente invención, que tiene la mutación descrita anteriormente en el gen de ciclina F-box (gen de ciclina F-box mutante que confiere la partenocarpia), puede presentar una reducción en la longitud del tallo principal y similares en comparación con la planta de tipo natural.

Asimismo, la planta de acuerdo con la presente invención, que tiene la mutación descrita anteriormente en el gen de ciclina F-box (gen de ciclina F-box mutante que confiere la partenocarpia), puede presentar una disminución en el período de tiempo requerido para la formación de frutos maduros y/o un aumento en el espesor de la pulpa del fruto, y similares en comparación con la planta de tipo natural.

La planta de acuerdo con la presente invención, que tiene la mutación descrita anteriormente en el gen de ciclina F-box (gen de ciclina F-box mutante que confiere la partenocarpia), es partenocárpica, pero preferentemente tiene fertilidad, es decir, la capacidad de dar frutos a través de la polinización y la fertilización.

La presente divulgación también se refiere a un método de reproducción que comprende cruzar plantas mediante una planta que tiene el gen de ciclina F-box mutante que comprende la mutación que altera la función del gen que confiere partenocarpia (la planta de acuerdo con la presente invención) como progenitor de la reproducción, obtener plantas de la descendencia y seleccionar una planta de la descendencia que tenga el gen de ciclina F-box mutante introducido en la misma. La expresión "cruzar plantas mediante una planta de acuerdo con la presente invención [...] como progenitor de la reproducción" se refiere al cruce de las plantas de acuerdo con la presente invención o al cruce de la planta de acuerdo con la presente invención con una planta de la misma especie o de una especie estrechamente relacionada con el fin de introducir la mutación descrita anteriormente en el gen de ciclina F-box (gen de ciclina F-box mutante que confiere la partenocarpia) contenida en la planta de acuerdo con la presente invención en una planta de la descendencia. El cruce puede realizarse una vez o repetidamente. Por ejemplo, la planta de acuerdo con la presente invención puede cruzarse con una planta de la misma especie o una especie estrechamente relacionada (progenitor recurrente), luego, la planta de la descendencia resultante puede cruzarse con el progenitor recurrente (retrocruzamiento), y la planta de la descendencia resultante adicional puede cruzarse con el progenitor recurrente repetidamente (retrocruzamiento continuo). Como alternativa, la planta de acuerdo con la presente invención puede cruzarse con una planta de la misma especie o una especie estrechamente relacionada, y luego la planta de la descendencia resultante puede cruzarse con una planta diferente de la misma especie o una especie estrechamente relacionada. Las plantas de la descendencia de la planta de acuerdo con la presente invención pueden autocruzarse repetidamente para fijar la mutación descrita anteriormente y las características resultantes de la mutación (p. ej., partenocarpia, aumento del contenido de azúcar de los frutos y modificación de las hojas) en el genoma de la planta.

Una planta de la descendencia que tiene el gen de ciclina F-box mutante introducido (es decir, una planta de la descendencia que tiene la mutación descrita anteriormente en el gen de ciclina F-box) puede seleccionarse mediante la detección del gen de ciclina F-box mutante en plantas de la descendencia. El gen de ciclina F-box mutante puede detectarse mediante, por ejemplo, la aplicación de diferentes métodos bien conocidos para detectar una mutación nucleotídica, tal como un método que implica la amplificación de ácidos nucleicos y/o la hibridación de Southern, etc., en una muestra de ácido nucleico (p. ej., ADN genómico, ARNm o ADNc transcrito de forma inversa a partir de ARNm) derivada de la planta de la descendencia. Por ejemplo, la presencia o ausencia de la mutación descrita anteriormente se puede determinar realizando la amplificación de ácido nucleico de una región que incluye la mutación descrita anteriormente del gen de ciclina F-box en el genoma, determinando la secuencia de nucleótidos de un producto de amplificación y comparando la secuencia de nucleótidos con la secuencia del genoma de tipo natural. Los expertos en la técnica pueden diseñar cebadores apropiados para dicha amplificación de ácidos nucleicos en función de la secuencia del genoma de una planta diana, p. ej., la secuencia de nucleótidos del gen de la ciclina F-box, y la posición y el tipo de la mutación introducida. Como alternativa, la presencia o ausencia de la mutación descrita anteriormente en la planta de la descendencia también se puede determinar en función de los resultados de la escisión de la enzima de restricción realizando una amplificación de ácido nucleico mediante un conjunto de cebadores que está diseñado de manera que un fragmento de amplificación que comprende la mutación descrita anteriormente se escinde exclusivamente con una enzima de restricción particular mientras que un fragmento de amplificación del gen de ciclina F-box de tipo natural no se escinde con la enzima de restricción, y escindiendo los productos de amplificación con la enzima de restricción. Un ejemplo del conjunto de cebadores que está diseñado de manera que un fragmento de amplificación que comprende la mutación descrita anteriormente se escinde exclusivamente con una enzima de restricción particular, mientras que un fragmento de amplificación del gen de ciclina F-box de tipo natural no se escinde con la enzima de restricción, es un conjunto de cebadores que comprende un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 (cebador directo) y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 6 (cebador inverso). En caso de que este conjunto de cebadores se utilice para amplificar el ADN derivado de tomatas (ADN genómico), un producto de amplificación de un gen de ciclina F-box que tiene una sustitución de citosina (C) en la posición 1193 definida basándose en la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 por adenina (A), tal como un gen de ciclina F-box mutante que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 3, se escinde exclusivamente con la enzima de restricción NcoI, mientras que un producto de amplificación del gen de ciclina F-box de tipo natural no se escinde con la enzima de restricción NcoI. Por lo tanto, en ese caso, el gen de ciclina F-box mutante descrito anteriormente en una tomatas de descendencia se puede detectar basándose en, p. ej., los resultados del tratamiento con la enzima de restricción NcoI del producto de amplificación obtenido con el conjunto de cebadores anterior, seguido de electroforesis. Por consiguiente, el conjunto de cebadores anterior es útil para la selección y discriminación de tomatas que tienen el gen de ciclina F-box mutante introducido. La presente divulgación también proporciona los cebadores y el conjunto de cebadores descritos anteriormente. Los cebadores de acuerdo con la presente descripción se pueden preparar mediante un método de síntesis química bien conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, los cebadores se pueden sintetizar mediante un sintetizador de ADN automatizado disponible en el mercado de acuerdo con los procedimientos utilizados comúnmente. Por ejemplo, los cebadores de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender una sustancia de marcaje (p. ej., una molécula fluorescente, una molécula de colorante, un isótopo radiactivo o un compuesto orgánico tal como la digoxigenina o la biotina) para facilitar la detección o amplificación de los cebadores y/o una secuencia adicional (p. ej., una parte del cebador en bucle utilizada en el método LAMP) en sus extremos 5' o 3'. Los cebadores de acuerdo con la presente divulgación pueden fosforilarse o aminorarse en sus extremos 5'. Los cebadores de acuerdo con la presente divulgación pueden ser ADN o ARN. En el caso del ARN, la "T (timina)" en una secuencia de ADN debe leerse como "U (uracilo)" para especificar su secuencia de nucleótidos. La presente divulgación también proporciona un kit que incluye el conjunto de cebadores de acuerdo con la presente divulgación.

El kit puede incluir además al menos uno seleccionado de entre polimerasas, enzimas de restricción (p. ej., *NcoI*), una instrucción y similares. Este kit también se prefiere para producir una tomatera partenocárpica y una planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto. El kit también se prefiere para la reproducción de tomateras.

- 5 Como alternativa, la detección del gen de ciclina F-box mutante que confiere la partenocarpia puede llevarse a cabo mediante un método para determinar la presencia o ausencia de una mutación, que comprende hibridar un producto de amplificación de una región introducida por mutación en el gen de ciclina F-box mutante con un producto de amplificación de la misma región, pero que no tiene mutación introducida en el gen de ciclina F-box de tipo natural para formar un heterodúplex y detectar un sitio de emparejamiento incorrecto, que se produce como resultado de la
10 introducción de una mutación, de una manera específica (p. ej., detección basada en la escisión específica del sitio de emparejamiento incorrecto con una nucleasa o similar). También se puede utilizar el método de F-PHFA basado en la combinación de hibridación competitiva y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), un método que implica la hibridación con una sonda que se une específicamente a una región que tiene la mutación descrita anteriormente, o basado en la combinación de tal hibridación y PCR en tiempo real, y similares. Se puede llevar a cabo una variedad de métodos de detección de mutaciones descritas anteriormente mediante productos disponibles en el mercado tales como secuenciador, sistema PCR, diferentes kits de detección de mutaciones, y similares.

- Una planta de la descendencia que tiene introducido el gen de ciclina F-box mutante que confiere partenocarpia
20 también puede seleccionarse basándose en cambios en la morfología o características de crecimiento de la planta de la descendencia provocados por la introducción del gen de ciclina F-box mutante. Por ejemplo, en relación con la planta de acuerdo con la presente invención, también es posible seleccionar una planta de la descendencia en función de los cambios en las hojas. Por ejemplo, en el caso de una tomatera, se considera que las hojas que comprenden una pluralidad de folíolos con bordes dentados (incisos) indican un fenotipo de planta de tipo natural, y el desarrollo
25 de hojas con bordes dentados más débiles y folíolos fusionados, en comparación con la planta de tipo natural, indica un fenotipo de la planta mutante (una planta que tiene el gen de ciclina F-box mutante introducido en la misma). Por lo tanto, la planta de tipo natural y la planta mutante se pueden distinguir entre sí en función de las diferencias en la morfología de la hoja. La tomatera de tipo natural y la planta mutante también se pueden distinguir basándose en las diferencias en la morfología de las hojas de la tomatera determinando la aparición o no de la fusión de folíolos. El verdor más intenso de la hoja de una tomatera (normalmente el valor SPAD) que el de la planta de tipo natural indica un fenotipo de la planta mutante. Por lo tanto, la distinción entre la tomatera de tipo natural y la planta mutante puede llevarse a cabo basándose en una diferencia en el color de las hojas como indicador. Asimismo, los otros fenotipos modificados descritos anteriormente (p. ej., un mayor contenido de azúcar en el fruto) que presenta la planta de acuerdo con la presente invención debido a la mutación descrita anteriormente en el gen de ciclina F-box, pueden
35 usarse como un indicador para seleccionar plantas de descendencia. Estos otros fenotipos pueden usarse solos como un indicador para la selección, pero preferentemente se usan como indicador junto con la detección del gen de ciclina F-box mutante o la selección basada en los cambios en las hojas.

- Es posible realizar la reproducción de una planta partenocárpica introduciendo el gen de ciclina F-box mutante que confiere partenocarpia en una planta de la descendencia como se ha descrito anteriormente. Además, es posible reproducir una planta que tenga un contenido de azúcar mejorado en el fruto introduciendo el gen de ciclina F-box mutante que confiere partenocarpia en una planta de la descendencia. De acuerdo con el método de reproducción de la presente divulgación, es posible conferir una variedad de fenotipos de las plantas mutantes descritas anteriormente a una planta introduciendo el gen de ciclina F-box mutante que confiere partenocarpia a una planta de la descendencia.

- En el contexto de la presente invención, el término "planta" incluye básicamente varias etapas de crecimiento y varias partes de una planta, tales como un cuerpo vegetal, tallos, hojas, raíces, flores, yemas, frutos (pulpa o pericarpio del fruto), semillas, tejidos, células y callos. Sin embargo, el término "planta" utilizado en la presente invención puede referirse al cuerpo de una planta de acuerdo con el contexto, y los expertos en la materia pueden entender fácilmente lo que significa el término. Los términos "tomate" y "tomatera" usados en la presente invención incluyen básicamente
50 varias etapas de crecimiento y varias partes, tales como un cuerpo vegetal, tallos, hojas, raíces, flores, yemas, frutos (pulpa o pericarpio del fruto), semillas, plántulas, tejidos, células y callos de un tomate, pero los términos pueden referirse a un cuerpo de fruto de tomate y tomatera respectivamente, dependiendo del contexto y los expertos en la materia pueden entender fácilmente lo que significan los términos. En una realización preferida, la planta de acuerdo con la presente invención es, pero sin limitación, una semilla, un fruto, una plántula o un cuerpo de una planta.

- Es posible cultivar la planta de acuerdo con la presente invención sin tratamiento de inducción partenocárpica tal como tratamiento de polinización o tratamiento con hormonas vegetales, induciendo así la fructificación y la obtención de frutos. El tratamiento de inducción partenocárpica puede realizarse o no durante el cultivo de la planta de acuerdo con la presente invención. Con el fin de obtener frutos partenocárpicos, la planta de acuerdo con la presente invención puede someterse a un tratamiento de emasculación antes de la floración. El tratamiento de emasculación permite evitar la polinización, obteniendo así frutos partenocárpicos con certeza. El cultivo se puede llevar a cabo mediante cualquier método de cultivo tal como cultivo hidropónico, cultivo en instalaciones (p. ej., cultivo en invernadero o cultivo en fábrica de plantas), cultivo en campo abierto o cultivo en macetas. La presente divulgación también se refiere a un
65 método para cultivar frutas, que comprende cultivar la planta de acuerdo con la presente invención sin tratamiento de inducción partenocárpica.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una planta que tiene un gen de ciclina F-box mutante que comprende una mutación diferente que altera la función del gen que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto; y un método para producirla. La planta de acuerdo con la presente invención tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto, en comparación con una planta que tiene el gen de ciclina F-box de tipo natural.

En la presente divulgación, una planta diana para la mejora del contenido de azúcar en el fruto es como se ha descrito anteriormente con respecto a una planta partenocárpica, y de manera particularmente preferida el tomate (una tomatara).

La planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto de acuerdo con la presente invención tiene preferentemente una mutación que altera la función del gen que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto introducida en el gen endógeno de ciclina F-box del genoma de la planta.

Un ejemplo de otro gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto como se usa en la presente invención es un gen de ciclina F-box, que tiene, como una mutación que altera la función de un gen que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto, una mutación nucleotídica que provoca una sustitución no conservativa de aminoácido serina en la posición 37 o glicina en la posición 301 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 en una proteína ciclina F-box. El gen de ciclina F-box mutante codifica una proteína ciclina F-box que tiene una sustitución no conservativa de aminoácido serina en la posición 37 o glicina en la posición 301 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2.

La sustitución no conservativa de aminoácido serina en la posición 37 se refiere a una sustitución de serina por un aminoácido que tiene propiedades diferentes a las de la serina. Específicamente, tal sustitución abarca una sustitución de serina (aminoácido no cargado polar hidrófilo) por un aminoácido alifático (hidrófobo; alanina o glicina), un aminoácido ramificado (hidrófobo; valina, leucina o isoleucina, otro aminoácido hidrófobo (metionina, prolina, fenilalanina o triptófano), un aminoácido ácido (ácido glutámico o ácido aspártico) o un aminoácido básico (lisina, arginina o histidina). En un aspecto preferido de la divulgación, la sustitución no conservativa de aminoácido serina es una sustitución de serina (hidrófila) por un aminoácido hidrófobo (alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina, triptófano); más preferentemente por un aminoácido ramificado (valina, leucina o isoleucina); y todavía más preferentemente por leucina. Una mutación nucleotídica que provoca una sustitución de serina por leucina es, por ejemplo, una mutación de cualquiera de los codones TCT, TCC, TCA, TCG, AGT y AGC en cualquiera de los codones TTA, TTG, CTT, CTC, CTA y CTG.

La sustitución no conservativa de aminoácido glicina en la posición 301 se refiere a una sustitución de glicina por un aminoácido que tiene propiedades diferentes a las de la glicina. Específicamente, tal sustitución abarca una sustitución de glicina (aminoácido hidrófobo, no polar) por un aminoácido polar no cargado (serina, treonina, glutamina, asparagina o cisteína), y aminoácido aromático (fenilalanina, tirosina o triptófano), un aminoácido ácido (ácido glutámico o ácido aspártico) o un aminoácido básico (lisina, arginina o histidina). En un aspecto preferido de la divulgación, una sustitución no conservativa de aminoácido glicina es una sustitución de glicina (aminoácido hidrófobo, no polar) por un aminoácido polar o un aminoácido hidrófilo (serina, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, triptófano, cisteína, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico o ácido glutámico); más preferentemente por un aminoácido básico (lisina, arginina o histidina); y más preferentemente por arginina. Una mutación nucleotídica que provoca una sustitución de glicina por arginina es, por ejemplo, una mutación de cualquiera de los codones GGT, GGC, GGA y GGG en cualquiera de los codones CGT, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG.

En el contexto de la presente divulgación, la expresión "serina en la posición 37 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2" o "glicina en la posición 301 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2" se refiere a serina o glicina que está alineada con la serina en la posición 37 o la glicina en la posición 301 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente, en una secuencia de aminoácidos arbitraria (una secuencia de aminoácidos de cualquier proteína ciclina F-box) alineada con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2.

El gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto puede tener un 80 % o más, preferentemente el 90 % o más, más preferentemente el 95 % o más, todavía más preferentemente el 98 % o más y de manera particularmente preferida el 99 % o más, p. ej., el 99,5 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 y codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución no conservativa de aminoácido serina en la posición 37 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. Esta sustitución no conservativa de aminoácido serina puede ser una sustitución de serina por un aminoácido que tiene propiedades diferentes a las de la serina, tal como un aminoácido alifático (hidrófobo; alanina o glicina), un aminoácido ramificado (hidrófobo; valina, leucina o isoleucina, otro aminoácido hidrófobo (metionina, prolina, fenilalanina o triptófano), un aminoácido ácido (ácido glutámico o ácido aspártico) o un aminoácido básico (lisina, arginina o histidina); más preferentemente una sustitución de serina por un aminoácido hidrófobo (alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina o triptófano); todavía más preferentemente una sustitución de serina por un aminoácido ramificado (valina, leucina o isoleucina); o de manera particularmente preferida una sustitución de serina por leucina. El gen de ciclina F-box mutante descrito anteriormente puede ser, pero sin limitación,

un mutante del gen de ciclina F-box de tipo natural de preferentemente una planta perteneciente a las *Solanaceae* o *Cucurbitaceae* y, más preferentemente de tomate. En particular, el gen de ciclina F-box mutante descrito anteriormente puede codificar la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20. La secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20 es una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de serina en la posición 37 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 (proteína ciclina F-box de tomate de tipo natural) por leucina. La presente divulgación también proporciona tal gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto.

El gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto puede tener un 80 % o más, preferentemente el 90 % o más, más preferentemente el 95 % o más, todavía más preferentemente el 98 % o más y de manera particularmente preferida el 99 % o más, p. ej., el 99,5 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 y codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución no conservativa de aminoácido glicina en la posición 301 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. Esta sustitución no conservativa de aminoácido glicina puede ser una sustitución de glicina por un aminoácido que tiene propiedades diferentes a las de la glicina, tal como un aminoácido polar sin carga (serina, treonina, glutamina, asparagina o cisteína), y aminoácido aromático (fenilalanina, tirosina o triptófano), un aminoácido ácido (ácido glutámico o ácido aspártico) o un aminoácido básico (lisina, arginina o histidina); más preferentemente una sustitución de glicina por un aminoácido polar o un aminoácido hidrófilo (serina, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, triptófano, cisteína, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico o ácido glutámico); más preferentemente una sustitución de glicina por un aminoácido básico (lisina, arginina o histidina); y particularmente preferentemente una sustitución de glicina por arginina. El gen de ciclina F-box mutante puede ser, pero sin limitación, preferentemente un mutante del gen de ciclina F-box de tipo natural de una planta perteneciente a las *Solanaceae* o *Cucurbitaceae*, y más preferentemente de tomate. En particular, el gen de ciclina F-box mutante descrito anteriormente puede codificar la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22. La secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22 es una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de glicina en la posición 301 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 (proteína ciclina F-box de tomate de tipo natural) por arginina. La presente divulgación también proporciona tal gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto.

El gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto puede codificar una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 mediante delección, sustitución, inserción o adición de 1 a 50, preferentemente de 1 a 40 y más preferentemente de 1 a 10, p. ej., de 1 a 5 restos de aminoácidos siempre que codifique una proteína mutante ciclina F-box que confiera el aumento en el contenido de azúcar en el fruto. Tal gen de ciclina F-box mutante puede contener una sustitución no conservativa de aminoácido serina en la posición 37 o glicina en la posición 301 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2.

El gen de ciclina F-box mutante descrito anteriormente que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto puede comprender: (i) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 19; o (ii) una secuencia de nucleótidos que tenga el 70 % o más, preferentemente el 80 % o más, más preferentemente el 90 % o más, más preferentemente el 95 % más, y particularmente preferentemente el 98 % o más, p. ej., el 99 % o más, o el 99,5 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 y que comprende una mutación del codón TCA (que codifica la serina) en las posiciones 109 a 111 definidas en función de la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 al codón TTA, TTG, CTT, CTC, CTA o CTG (que codifica la leucina), siempre que el gen mutante codifique una proteína ciclina F-box mutante que confiera un contenido de azúcar mejorado al fruto. Tal mutación puede ser, por ejemplo, una sustitución de citosina (C) en la posición 110 definida basándose en la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 en el gen de ciclina F-box por timina (T). El gen de ciclina F-box mutante puede comprender la secuencia de nucleótidos descrita anteriormente como una secuencia codificante de proteína (desde el codón de iniciación hasta el codón de terminación).

Como alternativa, el gen de ciclina F-box mutante descrito anteriormente que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto puede comprender: (i) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 22; o (ii) una secuencia de nucleótidos que tenga el 70 % o más, preferentemente el 80 % o más, más preferentemente el 90 % o más, más preferentemente el 95 % más, y particularmente preferentemente el 98 % o más, p. ej., el 99 % o más, o el 99,5 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 y que comprende una mutación del codón GGG (que codifica glicina) en las posiciones 901 a 903 definidas basándose en la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 al codón CGT, CGC, CGA, CGG, AGA o AGG (que codifica la leucina), siempre que el gen mutante codifique una proteína ciclina F-box mutante que confiera un contenido de azúcar mejorado al fruto. Tal mutación puede ser, por ejemplo, una sustitución de guanina (G) en la posición 901 definida basándose en la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 del gen de ciclina F-box por adenina (A). El gen de ciclina F-box mutante puede comprender la secuencia de nucleótidos descrita anteriormente como una secuencia codificante de proteína (desde el codón de iniciación hasta el codón de terminación).

La mutación que altera la función del gen que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto puede introducirse en el gen de ciclina F-box en una planta mediante métodos convencionales. Los aspectos específicos del método de la divulgación son los descritos anteriormente para la introducción de una mutación que confiere partenocarpia. La

presente divulgación también proporciona un método para producir una planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto, que comprende la introducción de una mutación que altera la función de un gen que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto, por ejemplo, una mutación nucleotídica que provoca una sustitución no conservativa de aminoácido serina en la posición 37 o glicina en la posición 301 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 en la proteína ciclina F-box, en el gen de ciclina F-box en una planta. De acuerdo con este método, es posible preparar fácilmente una planta capaz de producir frutos con un alto contenido de azúcar sin realizar tratamientos para lograr un alto contenido de azúcar tales como la sobrecarga.

La planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto de acuerdo con la presente invención es preferentemente homocigótica para el gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto.

También es posible introducir la mutación descrita anteriormente en una planta de la descendencia cruzando una planta mutante que tenga el gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto en el genoma, con un individuo vegetal diferente. Preferentemente, las plantas de descendencia obtenidas se examinan en busca de la presencia o ausencia del gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto y se seleccionan individuos vegetales que tienen el gen de ciclina F-box mutante.

Se puede examinar si el gen de ciclina F-box mutante confiere un contenido de azúcar mejorado en el fruto introduciendo la mutación en el gen de ciclina F-box mutante en el gen de ciclina F-box endógeno en una planta, midiendo el contenido de azúcar de los frutos polinizados (preferentemente frutos maduros) de la planta mutante resultante y comparando el contenido de azúcar con el contenido de azúcar de los frutos polinizados (preferentemente frutos maduros) de la planta de tipo natural medido de la misma manera. Si el contenido de azúcar aumenta (aumento estadísticamente significativo) en comparación con la planta de tipo natural, se puede determinar que el gen de ciclina F-box mutante que tiene la mutación confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto. Asimismo, se puede determinar si una planta que tiene el gen de ciclina F-box mutante tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto midiendo el contenido de azúcar en los frutos polinizados (preferentemente frutos maduros) de la planta y comparando el contenido de azúcar con el contenido de azúcar de los frutos polinizados (preferentemente frutos maduros) de la planta de tipo natural medido de la misma manera, confirmando así si hay o no un aumento en el contenido de azúcar. El contenido de azúcar de los frutos se puede medir mediante métodos convencionales. Sin embargo, en la presente invención, se puede utilizar el valor Brix (%) del zumo de los frutos como indicador del contenido de azúcar. El valor Brix se puede medir con un medidor de contenido de azúcar (p. ej., medidor de contenido de azúcar portátil BX-1; Kyoto Electronics Manufacturing Co., Ltd., Japón; o refractómetro portátil N-20E, ATAGO, Japón).

La expresión "tipo natural" en relación con una mutación que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto significa que el gen de ciclina F-box no tiene una mutación que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto. La planta que tiene un gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto puede ser o no partenocárpica mientras tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto. La definición de "planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto" es como se ha descrito anteriormente.

Una planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto obtenido mediante la introducción de una mutación que altera la función del gen que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto, tal como una mutación nucleotídica que provoca una sustitución no conservativa del aminoácido prolina en la posición 398, serina en la posición 37 o glicina en la posición 301 definida basándose en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 de la proteína ciclina F-box, en el gen de ciclina F-box en una planta; y una planta de la descendencia que mantiene la mutación se incluyen en el alcance de la planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto de acuerdo con la presente divulgación.

La planta de acuerdo con la presente invención, que tiene una mutación que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto en el gen de la ciclina F-box, también puede tener una variedad de cambios en la morfología o características de crecimiento, en comparación con la planta de tipo natural. Por ejemplo, la planta de acuerdo con la presente invención puede tener cambios en las hojas o los frutos. Por ejemplo, a diferencia de las hojas de las tomates de tipo natural comunes que comprenden una pluralidad de folíolos que tienen bordes dentados (incisos), la tomatera de acuerdo con la presente invención, que tiene un gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto, puede tener preferentemente anomalías en la morfología de las hojas, tales como bordes de hojas con dientes más débiles (reducción de la profundidad y el número de dientes de las hojas) y folíolos fusionados. Se puede observar una anomalía morfológica foliar particularmente fuerte en una tomatera que tiene un gen de ciclina F-box mutante que comprende una mutación nucleotídica que provoca una sustitución no conservativa del aminoácido prolina en la posición 398 o glicina en la posición 301 de acuerdo con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2.

La presente divulgación también se refiere a un método de reproducción vegetal, que comprende cruzar plantas mediante una planta que tiene el gen de ciclina F-box mutante que comprende la mutación que altera la función del gen que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto como progenitor reproductor, obtener plantas de la descendencia y seleccionar una planta de la descendencia que tenga el gen de ciclina F-box mutante introducido en la misma. La expresión "cruzar plantas mediante la planta de acuerdo con la presente invención [...] como progenitor

mejorado" en el contexto de la planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto se refiere al cruce de las plantas de acuerdo con la presente invención o al cruce de la planta de acuerdo con la presente invención con una planta de la misma especie o una especie estrechamente relacionada con el fin de introducir la mutación descrita anteriormente (gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto) en el gen de ciclina F-box de la planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto en una planta de la descendencia. El cruce puede realizarse una vez o repetidamente. Por ejemplo, la planta de acuerdo con la presente invención puede cruzarse con una planta de la misma especie o una especie estrechamente relacionada (progenitor recurrente), a continuación, la planta de la descendencia resultante puede cruzarse con el progenitor recurrente (retrocruzamiento), y la planta de la descendencia resultante adicional puede cruzarse con el progenitor recurrente repetidamente (retrocruzamiento continuo). Como alternativa, la planta de acuerdo con la presente invención puede cruzarse con una planta de la misma especie o una especie estrechamente relacionada, y luego la planta de la descendencia resultante puede cruzarse con una planta diferente de la misma especie o una especie estrechamente relacionada. Las plantas de la descendencia de la planta de acuerdo con la presente invención pueden autocruzarse repetidamente para fijar la mutación descrita anteriormente y un contenido de azúcar mejorado en el fruto resultante de la mutación en el genoma de la planta.

Una planta de la descendencia que tiene el gen de ciclina F-box mutante introducido que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto (es decir, una planta de la descendencia que tiene la mutación descrita anteriormente en el gen de ciclina F-box) puede seleccionarse mediante la detección del gen de ciclina F-box mutante en plantas de la descendencia. La detección del gen de ciclina F-box mutante es como se ha descrito anteriormente para la detección del gen de ciclina F-box mutante que confiere partenocarpia. La presencia o ausencia de la mutación descrita anteriormente en la planta de la descendencia también se puede determinar en función de los resultados de la escisión de la enzima de restricción realizando una amplificación del ácido nucleico mediante un conjunto de cebadores que está diseñado de manera que un fragmento de amplificación del gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto se escinde exclusivamente con una enzima de restricción particular, mientras que un fragmento de amplificación del gen de ciclina F-box de tipo natural no se escinde con la enzima de restricción. y escindiendo los productos de amplificación con la enzima de restricción. Un ejemplo de dicho conjunto de cebadores es un conjunto de cebadores que comprende un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 (cebador directo) y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 16 (cebador inverso). En caso de que este conjunto de cebadores se utilice para amplificar el ADN derivado de tomates (ADN genómico), un producto de amplificación de un gen de ciclina F-box que tiene una sustitución de guanina (G) en la posición 901 definida basándose en la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 por adenina (A), tal como un gen de ciclina F-box mutante que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 21, se escinde exclusivamente con la enzima de restricción *BsaXI*, mientras que un producto de amplificación del gen de ciclina F-box de tipo natural no se escinde con la enzima de restricción *BsaXI*. Por lo tanto, en ese caso, el gen de ciclina F-box mutante descrito anteriormente en una tomatera de descendencia se puede detectar basándose en, p. ej., los resultados del tratamiento con la enzima de restricción *BsaXI* del producto de amplificación obtenido con el conjunto de cebadores anterior, seguido de electroforesis. Otro ejemplo del conjunto de cebadores es un conjunto de cebadores que comprende un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 17 (cebador directo) y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 18 (cebador inverso). En caso de que este conjunto de cebadores se utilice para amplificar el ADN derivado de tomates (ADN genómico), un producto de amplificación de un gen de ciclina F-box que tiene una sustitución de citosina (C) en la posición 110 definida basándose en la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 por timina (T), tal como un gen de ciclina F-box mutante que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 19, se escinde exclusivamente con la enzima de restricción *XspI*, mientras que un producto de amplificación del gen de ciclina F-box de tipo natural no se escinde con la enzima de restricción *XspI*. Por lo tanto, en ese caso, el gen de ciclina F-box mutante descrito anteriormente en una tomatera de descendencia se puede detectar basándose en, p. ej., los resultados del tratamiento con la enzima de restricción *XspI* del producto de amplificación obtenido con el conjunto de cebadores anterior, seguido de electroforesis. Por consiguiente, los conjuntos de cebadores anteriores son útiles para la selección y discriminación de tomates que tienen el gen de ciclina F-box mutante introducido. La presente divulgación también proporciona los cebadores y conjuntos de cebadores descritos anteriormente. Los cebadores de acuerdo con la presente descripción se pueden preparar mediante un método de síntesis química bien conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, los cebadores se pueden sintetizar mediante un sintetizador de ADN automatizado disponible en el mercado de acuerdo con los procedimientos utilizados comúnmente. Por ejemplo, los cebadores de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender una sustancia de marcaje (p. ej., una molécula fluorescente, una molécula de colorante, un isótopo radiactivo o un compuesto orgánico tal como la digoxigenina o la biotina) para facilitar la detección o amplificación de los cebadores y/o una secuencia adicional (p. ej., una parte del cebador en bucle utilizada en el método LAMP) en sus extremos 5' o 3'. Los cebadores de acuerdo con la presente divulgación pueden fosforilarse o aminorarse en sus extremos 5'. Los cebadores de acuerdo con la presente divulgación pueden ser ADN o ARN. En el caso del ARN, "T (timina)" en una secuencia de ADN se leerá como "U (uracilo)" para especificar su secuencia de nucleótidos. La presente divulgación también proporciona un kit que incluye el conjunto de cebadores de acuerdo con la presente divulgación. El kit puede incluir además al menos uno seleccionado de entre polimerasas, enzimas de restricción (p. ej., *BsaXI* o *XspI*), una instrucción y similares. Este kit se prefiere para producir una planta que tenga un contenido de azúcar mejorado en el fruto. El kit también se prefiere para la reproducción de tomates.

Como alternativa, la detección del gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto puede llevarse a cabo mediante un método para determinar la presencia o ausencia de una mutación, que comprende hibridar un producto de amplificación de una región introducida por mutación en el gen de ciclina F-box mutante con un producto de amplificación de la misma región, pero que no tiene mutación introducida en el gen de ciclina F-box de tipo natural para formar un heterodúplex y detectar un sitio de emparejamiento incorrecto, que se produce como resultado de la introducción de una mutación, de una manera específica (p. ej., detección basada en la escisión específica del sitio de emparejamiento incorrecto con una nucleasa o similar). El método de F-PHFA basado en la combinación de hibridación competitiva y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), también se puede usar un método que implica la hibridación con una sonda que se une específicamente a una región que tiene la mutación descrita anteriormente o se basa en la combinación de tal hibridación y PCR en tiempo real, y similares. Se puede llevar a cabo una variedad de métodos de detección de mutaciones descritas anteriormente mediante productos disponibles en el mercado tales como secuenciador, sistema PCR, diferentes kits de detección de mutaciones, y similares.

También se puede seleccionar una planta de la descendencia que tenga introducido el gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto basándose en cambios en la morfología o características de crecimiento de la planta de la descendencia provocados por la introducción del gen de ciclina F-box mutante. Por ejemplo, en relación con la planta de acuerdo con la presente invención, también es posible seleccionar una planta de la descendencia basándose en una anomalía morfológica foliar. Dichos cambios pueden usarse solos como un indicador para la selección, pero preferentemente se utilizan como indicador junto con la detección del gen de ciclina F-box mutante.

Es posible cultivar una planta que tenga un contenido de azúcar mejorado en el fruto introduciendo el gen de ciclina F-box mutante que confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto de una planta de la descendencia como se ha descrito anteriormente.

La definición y explicación del término "planta" en el contexto de la planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto es como se ha descrito anteriormente para la planta partenocárpica.

El gen de ciclina F-box participa, p. ej., en la formación de frutos y hojas. En particular, una sustitución no conservativa de aminoácido (p. ej., una sustitución entre un aminoácido hidrófobo y un aminoácido hidrófilo) en el gen de ciclina F-box del genoma de la planta puede producir un contenido de azúcar mejorado en el fruto al modificar la función de la proteína ciclina F-box. Por tanto, la presente divulgación proporciona un método para el cribado de una planta que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto, que comprende introducir una mutación nucleotídica que provoca una sustitución no conservativa de aminoácido en el gen de ciclina F-box de una planta y seleccionar una planta que tenga un contenido de azúcar mejorado en el fruto en comparación con la planta de tipo natural. Una mutación nucleotídica que provoca una sustitución no conservativa de aminoácido puede introducirse en cualquier sitio del gen endógeno (genómico) de la ciclina F-box de una planta. La introducción de una mutación nucleotídica que provoca una sustitución de aminoácido no conservativa se puede realizar como se ha descrito anteriormente. Se cultiva una planta que tiene la mutación introducida, se obtienen frutos de la misma y se mide el contenido de azúcar en el fruto. Una planta que tiene la mutación introducida preferentemente porta homocigotamente la mutación (gen de ciclina F-box mutante). El contenido de azúcar en el fruto se puede medir para frutos polinizados (frutos con semillas) o frutos partenocárpicos. La medición del contenido de azúcar en el fruto y la comparación con el contenido de azúcar en el fruto de la planta de tipo natural se pueden realizar como se ha descrito anteriormente. Si el contenido de azúcar se ha aumentado (aumento estadísticamente significativo) en comparación con el contenido de azúcar de los frutos polinizados (preferentemente frutos maduros) de la planta de tipo natural medido de la misma manera, se puede determinar que la planta que tiene una mutación nucleotídica que provoca la sustitución no conservativa de aminoácido o el gen de ciclina F-box mutante que comprende tal mutación confiere un contenido de azúcar mejorado al fruto. Basándose en la determinación, es posible seleccionar una planta que tenga un contenido de azúcar mejorado en el fruto. El presente método también comprende preferentemente verificar la introducción de una mutación nucleotídica que provoca una sustitución de aminoácido no conservativa en el gen de ciclina F-box. Por ejemplo, la introducción de una mutación nucleotídica que provoca una sustitución no conservativa de aminoácido en el gen de ciclina F-box puede confirmarse mediante la secuenciación del gen de ciclina F-box de una planta en la que se ha introducido la mutación, y luego el contenido de azúcar en el fruto para una planta con la mutación introducida confirmada. El cultivo, la recolección de los frutos y la medición del contenido de azúcar en el fruto de la manera descrita anteriormente solo para individuos vegetales que se ha confirmado que tienen el gen de ciclina F-box mutante, puede dar lugar a procesos de prueba más eficientes. De acuerdo con el método de cribado de la presente divulgación, pueden obtenerse eficientemente plantas que tengan un contenido de azúcar mejorado en el fruto debido a cualquiera de varias mutaciones no conservativas de aminoácidos en el gen de ciclina F-box.

Ejemplos

La presente invención se describirá específicamente en los siguientes ejemplos.

[Ejemplo 1] Producción de cepas mutantes de tomate y selección de cepas partenocárpicas de tomate

Se llevó a cabo el tratamiento con EMS (tratamiento de mutagénesis con EMS) dejando que 3000 semillas de la variedad de tomate de tipo natural Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) absorbieran agua estéril a temperatura ambiente durante 4 horas y, a continuación, se sumergieron las semillas en 100 ml de solución de metanosulfonato de etilo (EMS) al 1,0 % con agitación durante 16 horas. Se extrajeron las semillas de la solución de EMS y se lavaron con 100 ml de agua estéril durante 4 horas con agitación. Este proceso de lavado se repitió 3 veces. A continuación, las semillas se dejaron germinar en papel de filtro humedecido con agua estéril y se cultivaron en un invernadero de cristal. Se formaron semillas M2 por autopolinización a partir de cada cepa (generación M1) y se recogieron. Se sembraron diez semillas M2 por cepa y se cultivaron en macetas conectadas que contenían tierra de cultivo en un invernadero de cristal. Por tanto, se obtuvo una población micro mutagenizada con EMS de plantas de tomate. Entre las cepas M2 se seleccionaron individuos (cepas) que mostraban altas tasas de fructificación y se recogieron semillas de cada una de las cepas seleccionadas.

Las semillas recogidas se sembraron en papel de filtro humedecido con agua estéril, y las semillas germinadas se asentaron en lana de roca (minibloque; tamaño: 50 cm x 50 cm x 50 cm, Grodan) para cultivo. El cultivo se llevó a cabo en una fábrica de plantas a 25 °C con una duración del día de 16 horas (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad por día). El riego se realizó haciendo circular una solución nutritiva preparada a partir de los fertilizantes de nutricultura OAT House 1 y OAT House 2 (OAT Agrio Co., Ltd.) a una conductividad eléctrica (CE) de aproximadamente 1,5 ms/cm una vez al día durante el cultivo.

Los individuos vegetales cultivados de cada cepa se examinaron mediante la prueba de partenocarpia para determinar la tasa de partenocarpia. En la prueba partenocárpica, se realizó un tratamiento de emasculación antes de la floración y, a continuación, se examinó el número de fructificaciones (es decir, el número de frutos). La tasa partenocárpica (%) se calculó como la proporción del número de fructificaciones con respecto al número de flores emasculadas dentro de la misma cepa.

Como resultado, una cepa mostró una alta tasa partenocárpica del 67 %. Esta cepa, la cepa E8986, se seleccionó como una cepa mutante partenocárpica y se usó para análisis posteriores. Específicamente, se examinaron las características de crecimiento, las características del fruto y la naturaleza hereditaria de esta cepa mutante partenocárpica y se realizó el mapeo de los genes causales en los siguientes ejemplos.

[Ejemplo 2] Características de crecimiento de la cepa mutante de tomate partenocárpico

Se utilizaron semillas de la cepa mutante de tomate partenocárpico (cepa E8986) seleccionada en el Ejemplo 1 y de la variedad de tomate de tipo natural Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) (22 y 24 semillas, respectivamente) para comparar las cepas en términos de características de crecimiento. La diferencia significativa entre los datos obtenidos de los grupos de tratamiento se probó con la prueba HSD de Tukey-kramer.

Se dejó que las semillas absorbieran agua estéril durante 3 días. Tras la absorción de agua durante 3 días, las semillas se depositaron en lana de roca (minibloque; tamaño: 50 cm x 50 cm x 50 cm, Grodan) y se cultivaron en una fábrica de plantas a 25 °C con una duración del día de 16 horas hasta 8 semanas una vez asentada la plantación. El riego se realizó haciendo circular una solución nutritiva (formulación Otsuka House A) preparada a partir de fertilizantes de nutricultura OAT House 1 y OAT House 2 a una conductividad eléctrica (CE) de aproximadamente 1,5 ms/cm una vez al día durante el cultivo.

Tras el asentamiento de la plantación, la longitud del tallo principal se examinó cada 2 semanas durante 8 semanas. El valor SPAD de la hoja (es decir, el valor del índice del contenido de clorofila) también se examinó 8 semanas después del asentamiento de la plantación. El valor SPAD se midió con un medidor de clorofila (SPAD-502 Plus, Konica Minolta, Inc.) 8 semanas después del asentamiento de la plantación. El valor SPAD se determinó para las hojas primera a tercera en el ápice del tallo principal, y se calculó la media del mismo. Asimismo, se observó la morfología foliar. Las figuras 1 a 3 muestran los resultados.

Se encontró que la cepa mutante partenocárpica tenía una morfología foliar característica. La cepa de tipo natural tenía hojas dentadas, mientras que la cepa mutante presentaba hojas con bordes menos dentados y la morfología de las mismas mostró fusión de folíolos (figura 1).

En comparación con la cepa de tipo natural, el crecimiento de la cepa mutante ya comenzó a disminuir en términos de la longitud del tallo principal 2 semanas después del asentamiento de la plantación, y la longitud media del tallo principal fue de 6,6 cm para la cepa de tipo natural y de 5,6 cm para la cepa mutante 8 semanas después del asentamiento de la plantación (figura 2). Se demostró que la longitud del tallo principal de la cepa mutante tuvo una reducción estadísticamente significativa en comparación con la de la cepa de tipo natural en cada semana examinada (figura 2). Como la cepa mutante tiene una longitud de tallo principal más corta, sería más conveniente para un trabajo de formación de tallos. Además, el valor SPAD (medio) de la hoja de la cepa mutante mostró un aumento estadísticamente significativo en comparación con el de la cepa de tipo natural, indicando que el color de la hoja de la cepa mutante era oscuro (figura 3).

[Ejemplo 3] Características del fruto de la cepa mutante de tomate partenocárpico

Se cultivaron individuos vegetales de la cepa mutante de tomate partenocárpico (mutante) seleccionada en el Ejemplo 1 y la variedad de tomate de tipo natural Micro-Tom (tipo natural) (13 y 10 individuos, respectivamente) para comparar las cepas en términos de características del fruto. La diferencia significativa entre los datos obtenidos de los grupos de tratamiento se probó con la prueba HSD de Tukey-kramer.

Las cepas de tipo natural y mutantes se sometieron a un tratamiento de polinización después de la floración o a un tratamiento de emasculación antes de la floración. El tratamiento de polinización se realizó haciendo vibrar las flores mediante un vibrador (polinización por vibración). El número de frutos se restringió a dos por racimo floral y se eliminó el exceso de frutos. Los frutos con pericarpio completamente rojo (es decir, frutos rojos maduros) se recolectaron y se examinaron inmediatamente para determinar las características del fruto. Para el examen de las características del fruto, se determinaron la tasa de fructificación/tasa partenocárpica, el espesor de la pulpa del fruto, el valor Brix (índice de contenido de azúcar) y el número de semillas. La tasa de fructificación en el caso del tratamiento de polinización se calculó como la proporción (%) de la suma del número de frutos con semillas y el número de frutos sin semillas (frutos partenocárpicos) con respecto al número de flores abiertas. La tasa partenocárpica en este caso se calculó como la proporción (%) del número de frutos sin semillas (frutos partenocárpicos) con respecto al número de flores polinizadas. La tasa de fructificación en el caso del tratamiento de emasculación, que corresponde a la tasa partenocárpica, se calculó como la proporción (%) del número de fructificaciones con respecto al número de flores emasculadas. Se midió el valor Brix para el zumo de los frutos recogidos utilizando un medidor de contenido de azúcar (medidor de contenido de azúcar portátil, BX-1, KEM). En cuanto al espesor de la pulpa del fruto, el valor Brix y el número de semillas, se calculó el valor medio de todos los frutos rojos maduros recolectados de cada individuo, y luego se calculó adicionalmente el valor medio de los individuos para cada grupo.

En el grupo de tratamiento con cepas de tipo natural y el grupo de tratamiento con cepas mutantes, la tasa media de fructificación fue del 91,7 % para la cepa de tipo natural sometida al tratamiento de polinización y del 0 % para la cepa de tipo natural sometida al tratamiento de emasculación, mientras que la tasa media de fructificación fue del 84 % para la cepa mutante sometida al tratamiento de polinización (frutos con semillas: 81 %; y frutos partenocárpicos: 3 %) y 64 % para la cepa mutante sometida a tratamiento de emasculación. Estos resultados mostraron que la tasa partenocárpica de la cepa mutante supera aproximadamente el 60 %.

El número de días necesarios desde el tratamiento de polinización o el tratamiento de emasculación hasta la formación de frutos rojos maduros fue de $50 \pm 1,2$ días, $46 \pm 1,0$ días y $33 \pm 0,5$ días (media $\pm$ error típico) para la cepa de tipo natural sometida a tratamiento de polinización, la cepa mutante sometida a tratamiento de polinización y la cepa mutante sometida a tratamiento de emasculación, respectivamente. Se demostró que los frutos formados en la cepa mutante sometida al tratamiento de emasculación (frutos partenocárpicos) se convierten en frutos rojos maduros con un número estadísticamente significativo menor de días, en comparación con la cepa de tipo natural y la cepa mutante sometida al tratamiento de polinización.

También hubo una diferencia en el espesor de la pulpa del fruto. Se demostró que el espesor de la pulpa de los frutos de la cepa mutante sometida al tratamiento de polinización y el de los frutos de la cepa mutante sometida al tratamiento de emasculación tuvo un aumento estadísticamente significativo en comparación con el de los frutos de la cepa de tipo natural sometida al tratamiento de polinización (figura 4).

La media del valor Brix como índice de contenido de azúcar fue del 5,3 % para los frutos de la cepa tipo natural sometida a tratamiento de polinización (frutos con semillas/frutos polinizados) y del 6,7 % para frutos de la cepa mutante sometida al tratamiento de polinización, mientras que la misma aumentó significativamente hasta el 10,3 % para los frutos de la cepa mutante sometida al tratamiento de emasculación (frutos partenocárpicos) (figura 5). Hubo diferencia significativa a $p < 0,001$ según la prueba Tukey-kramer HSD entre los valores Brix de los frutos partenocárpicos de la cepa mutante y los frutos de las cepas tipo natural y mutante sometidas a tratamiento de polinización (frutos con semillas/frutos polinizados). Además, también hubo una diferencia significativa en $p < 0,001$ por la prueba Tukey-kramer HSD entre los valores Brix de los frutos de la cepa de tipo natural sometida a tratamiento de polinización y los frutos de la cepa mutante sometida a tratamiento de polinización. Como se ha descrito anteriormente, tanto los frutos con semillas obtenidos mediante el tratamiento de polinización como los frutos sin semillas obtenidos mediante el tratamiento de emasculación (frutos partenocárpicos) de la cepa mutante tenían un contenido de azúcar más alto que los de la cepa de tipo natural, lo que indica que la cepa mutante produce frutos con alto contenido de azúcar (figura 5).

Los resultados anteriores revelaron que la cepa mutante de tomate partenocárpica (mutante) obtenida en el Ejemplo 1 es una tomatera mutante que tiene un contenido de azúcar mejorado en el fruto, así como partenocarpia.

Además, la cepa de tipo natural sometida al tratamiento de polinización formó un promedio de 40 semillas por fruto, y la cepa mutante sometida al tratamiento de polinización formó un promedio de 24 semillas por fruto (figura 6). El número de semillas recolectadas de las cepas mutantes es mayor que la mitad del de la cepa de tipo natural, lo que indica que la cepa mutante no tiene problema en la productividad de semillas requerida para la reproducción.

[Ejemplo 4] Identificación del gen causal que induce la partenocarpia y mejora el contenido de azúcar en la cepa

mutante

(1) Análisis de la naturaleza hereditaria en la cepa mutante del tomate partenocárpico (mutante)

- 5 Se cruzó la cepa mutante de tomate partenocárpico (cepa E8986; mutante) seleccionada en el Ejemplo 1 con la variedad de tomate de tipo natural Micro-Tom (tipo natural), y se recogieron las semillas F_1 así formadas. Las semillas F_1 se sembraron y cultivaron. Después de la floración, se llevó a cabo la autopolinización y se recogieron las semillas F_2 así formadas. Las semillas F_2 se sembraron y cultivaron. Específicamente, las semillas, tras 3 días de absorción de agua, se sembraron en macetas conectadas, cada una de ellas con tierra de cultivo, y se cultivaron en un invernadero de cristal. Después de la floración, se potenció la fructificación mediante polinización por vibración realizada con un vibrador. Se recolectaron semillas de los frutos obtenidos.

10 Las semillas F_1 y F_2 obtenidas se examinaron para determinar la proporción de segregación entre el fenotipo de tipo natural y el fenotipo mutante basándose en las diferencias en la morfología foliar de las plantas de tomate cultivadas a partir de las semillas respectivas (fusión de folíolos en el caso de las hojas mutantes).

15 Como resultado, la proporción de segregación entre el fenotipo de tipo natural y el fenotipo mutante fue de 6:0 en la población F_1 , y de 77:30 en la población F_2 . Se realizó la prueba de χ^2 y los resultados mostraron que es muy probable que la tasa de segregación en la población F_2 coincida con una tasa de segregación esperada de 3:1 (bajo la hipótesis nula de que la tasa de segregación sea 3:1, el valor de χ^2 es 0,53 con un valor de p de 0,47), lo que indica que el gen causal (mutación causal) que confiere el fenotipo mutante es recesivo simple.

[Ejemplo 5] Mapeo aproximado del gen causal

- 25 Se realizó un mapeo aproximado del gen causal en el genoma del tomate basándose en los resultados del Ejemplo 4. En primer lugar, se cruzó la cepa mutante de tomate partenocárpico (mutante) seleccionada en el Ejemplo 1 con *Solanum pimpinellifolium*, que es una especie estrechamente relacionada con el tomate. Se recogieron las semillas F_1 así formadas. Las semillas F_1 se sembraron y cultivaron. Después de la floración, se llevó a cabo la autopolinización y se recogieron las semillas F_2 así formadas. Las semillas F_2 se sembraron y cultivaron. Específicamente, las semillas, tras 3 días de absorción de agua, se sembraron en macetas conectadas, cada una de ellas con tierra de cultivo, y se cultivaron en un invernadero de cristal. De la población F_2 obtenida, se seleccionaron 22 individuos que presentaban el fenotipo mutante (hojas con folíolos fusionados).

35 Se recolectaron tres folíolos de cada uno de los 22 individuos seleccionados para la extracción de ADN. Los folíolos recolectados se congelaron usando nitrógeno líquido y los folíolos se trituraron usando un micromortero. El ADN se extrajo de los folíolos triturados utilizando el kit de purificación de ADN tisular Maxwell^(R) 16 (Promega) y un instrumento automatizado de purificación de ADN (Maxwell^(R) 16 Instrument, Promega). El ADN extraído se utilizó para el análisis de polimorfismos basado en el Proyecto Agrícola Coordinado de *Solanaceae* (SolCAP). Basándose en los resultados del análisis SolCAP, se calculó la frecuencia génica del gen causal derivado del mutante y se delimitó el locus cromosómico en el que se encontraba el gen causal. Había una región con una alta frecuencia génica de 0,87 a 0,93 para el gen causal derivado del mutante en una región de aproximadamente 77,4 Mb (77351578 pb) a 79,8 Mb (79847862 pb) (aproximadamente 4,3 Mb) en el cromosoma 1 del tomate. Por lo tanto, se consideró que el gen causal estaba posicionado en esa región.

45 [Ejemplo 6] Identificación del gen causal basado en el análisis del genoma

(1) Identificación de mutaciones mediante el análisis del genoma

- 50 Como se describe en el Ejemplo 4, se cruzó la cepa mutante de tomate partenocárpico (mutante) seleccionada en el Ejemplo 1 con la variedad de tomate de tipo natural Micro-Tom (tipo natural), las semillas F_1 obtenidas se cultivaron y autopolinizaron, y las semillas F_2 así obtenidas se sembraron y cultivaron. Se seleccionaron 29 individuos que mostraban el fenotipo mutante (hojas con folíolos fusionados). Se recogieron tres folíolos de cada uno de estos 29 individuos. La extracción de ADN de los folíolos se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 5. Después de la extracción del ADN, se añadió una décima parte (1/10) de volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 veces de volumen de etanol al 99,5 %, y una centésima parte (1/100) de volumen de Ethachinmate (Nippon Gene Co., Ltd., Japón) para la precipitación con etanol. Después de la precipitación con etanol, se lavó el ADN añadiendo etanol al 70 % y se preparó una solución de ADN con agua estéril. Después de la precipitación con etanol, se mezclaron cantidades iguales de ADN de los respectivos individuos para formar ADN en masa y se realizó un análisis de secuencia de próxima generación con un secuenciador Illumina HiSeq 2000. La secuencia de nucleótidos obtenida se alineó con la secuencia de referencia de tipo natural, identificando así mutaciones.

65 Como resultado, el número de mutaciones generadas en la región de aproximadamente 77,4 Mb (77351578 pb) a 79,8 Mb (79847862 pb) del cromosoma 1 fue de 186. Entre las mutaciones, se encontró una mutación en las regiones traducidas (185 mutaciones en las regiones no traducidas) y se descubrió que el locus genético en el que estaba presente la única mutación codificaba la proteína ciclina F-box, que es una proteína de la familia F-box (Figura 7). La mutación en el gen de ciclina F-box fue una mutación sin sentido, en la que el codón CCA está mutado a CAA

(sustitución nucleotídica de citosina con adenina) para cambiar un aminoácido de prolina a glutamina (figura 7). Dado que la prolina es un aminoácido hidrófobo, mientras que la glutamina es un aminoácido hidrófilo, se considera que la mutación del aminoácido provoca un cambio en la conformación de la proteína ciclina F-box. Los resultados anteriores sugirieron que esta mutación en el gen de ciclina F-box produjo un fenotipo mutante (p. ej., hojas con folíolos fusionados, partenocarpia y alto contenido de azúcar).

La secuencia de nucleótidos (secuencia CDS) que codifica la proteína ciclina F-box del tomate mutante obtenido mediante el análisis de secuencias descrito anteriormente se expone en la SEQ ID NO: 3, y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos se expone en la SEQ ID NO: 4. Además, la secuencia de nucleótidos (secuencia CDS) que codifica la proteína ciclina F-box de la variedad de tomate de tipo natural Micro-Tom se expone en la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos se expone en la SEQ ID NO: 2. El sitio de mutación descrito anteriormente (C->A) en el gen de ciclina F-box del tomate corresponde al nucleótido en la posición 1193 de la SEQ ID NO: 1 y 3. Además, el sitio de mutación corresponde al aminoácido en la posición 398 en las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 2 y 4.

(2) Genotipado usando marcadores dCAPS

Como se describe en el Ejemplo 4, se cruzó la cepa mutante de tomate partenocárpico (mutante) seleccionada en el Ejemplo 1 con la variedad de tomate de tipo natural Micro-Tom (tipo natural), las semillas F₁ obtenidas se cultivaron y autopolinizaron, y las semillas F₂ así obtenidas se sembraron y cultivaron. Se obtuvieron 128 individuos F₂ (población F₂). Se distinguieron fenotipos de tipo natural y mutantes para 128 individuos en función de las diferencias en la morfología foliar. Como resultado, 104 individuos mostraron el fenotipo de tipo natural (sin fusión de folíolos) y 24 individuos mostraron el fenotipo mutante (con fusión de folíolos). Se recogieron tres folíolos de cada uno de los 128 individuos F₂. La extracción de ADN de los folíolos se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 5.

Seguidamente, se realizó una PCR mediante el ADN extraído como molde y los cebadores dCAPS, amplificando así una región que incluye el sitio de mutación en el gen de ciclina F-box. La composición de una solución de reacción de PCR contenía 12,5 µl de 2x Go Taq^(R) GreenMaster Mix (Promega), 2,5 µl de cada uno de los cebadores 10 µM, 6,5 µl de agua estéril y 1 µl de ADN molde (25 µl en total). Los cebadores dCAPS se diseñaron de manera que un producto de PCR para la cepa de tipo natural se dirigiera exclusivamente con la enzima de restricción NcoI mientras que un producto de PCR para la cepa mutante no se dirigió con la misma. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores dCAPS (marcadores dCAPS) utilizados fueron los siguientes: cebador directo: 5'-CCC GCATGCCACACAAGTATTT-3' (SEQ ID NO: 5) y cebador inverso: 5'-ATCACATATCAGGGAGACATCTCAAGCCAT-3' (SEQ ID NO: 6). Las condiciones de la reacción de PCR fueron desnaturalización térmica a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 2 minutos; y, a continuación, a 72 °C durante 7 minutos. Después de la PCR, se añadieron 0,5 µl de la enzima de restricción NcoI a 10 µl del producto de la PCR, y se dejó reposar la mezcla a 37 °C durante 16 horas para la digestión del ADN. La muestra de ADN digerida se incubó a 70 °C durante 15 min, inactivando así la enzima de restricción. Después de ello, se sometió la muestra de ADN a electroforesis utilizando gel de agarosa al 1,5 %. Como control, se analizó de la misma manera el ADN extraído de folíolos de la variedad de tomate de tipo natural Micro-Tom.

La figura 8 muestra los resultados. Se observaron bandas del fragmento de ácido nucleico (241 pb) amplificado con los cebadores directo e inverso y el fragmento escindido con NcoI del mismo (210 pb). Aunque 104 individuos de F₂, que presentaban el fenotipo de tipo natural, tenían bandas que indicaban un homocigoto o heterocigoto dominante (38 individuos homocigotos dominantes y 66 individuos heterocigotos dominantes), los 24 individuos de F₂, que presentaban el fenotipo mutante, tenían una banda que indicaba un homocigoto recesivo (figura 8, Tabla 1). También se demostró que la proporción de segregación para 128 individuos de F₂ de acuerdo con los resultados es muy probable que coincida con una proporción de segregación esperada de 1:2:1 (Tabla 1). Dado que el fenotipo coincide completamente con el genotipo, se indicó que es muy probable que el gen de ciclina F-box sea el gen causal. Esto apoyó que la mutación inductora de partenocarpia descrita anteriormente en el gen de ciclina F-box provocó el fenotipo característico en la cepa mutante. Además, se demostró que los marcadores dCAPS usados anteriormente también pueden usarse como marcadores de enlace del gen causal.

Tabla 1

Fenotipo de la población F ₂							Proporción de segregación esperada (W/W: W/m: m/m)	Valor de x ²	Valor de <i>p</i>
Progenitores para el cruzamiento	Tipo natural			Mutante					
	Genotipo			Genotipo					
	W/W	W/m	m/m	W/W	W/m	m/m			
Tipo natural x mutante	38	66	0	0	0	24	1:2:1	3,19	0,20
W/W, Homocigoto dominante; W/m, heterocigoto; m/m, heterocigoto recesivo.									

[Ejemplo 7] Análisis de la secuencia del gen ciclina F-box de variedades comerciales

Se analizó la secuencia de nucleótidos del gen de ciclina F-box para la cepa mutante partenocárpica de tomate seleccionada en el Ejemplo 1 (cepa E8986; mutante) (en lo sucesivo también denominado Micro-Tom mutante); la variedad de tomate de tipo natural Micro-Tom (en adelante también denominada Micro-Tom de tipo natural); y 9 variedades comerciales de tomate: "Aichi First", "House Momotaro", "Zuiko 102", "Reiyou", "Reika", "Ailsa Craig", "Money maker", "M82" y "Levanzo".

Las semillas después de la absorción del agua durante 3 días se sembraron en macetas conectadas (Shinwa Co., Ltd.), cada una de las cuales contenía suelo de cultivo (Jiffy Mix, Sakata Seed Corporation) como recipientes de cultivo y se cultivaron en un invernadero de cristal. Se recogieron tres folíolos de cada estirpe o variedad, se congelaron con nitrógeno líquido y se trituraron con un micromortero. Después de triturar, se extrajo el ADN de los mismos utilizando el kit de purificación de ADN tisular Maxwell^(R) 16 (Promega) y un instrumento automatizado de purificación de ADN (Maxwell^(R) 16 Instrument, Promega). Después de la extracción del ADN, una región que incluía el sitio de mutación en el gen de ciclina F-box se amplificó mediante PCR. La composición de una solución de reacción de PCR contenía 1 µl de molde de ADN, 5 µl de tampón KOD-Plus Neo, 5 µl de dNTP 25 mM, 3 µl de MgSO₄ 2 mM, 1,5 µl de cada uno de los cebadores 10 µM, 32 µl de agua estéril y 1,0 µl de KOD Plus Neo (50 µl en total). Las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados para la PCR fueron las siguientes: cebador directo: 5'-GGAAACCAGACCGTCCTGAC-3' (SEQ ID NO: 7); y cebador inverso: 5'-TGCATTGAGAGGAGCTAGGG-3' (SEQ ID NO: 8). Las condiciones de la reacción de PCR fueron desnaturalización térmica a 94 °C durante 2 minutos, seguida de 45 ciclos a 98 °C durante 10 segundos, 57 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 1 minuto. Después de ello, la solución de reacción de PCR se sometió a electroforesis con gel de agarosa al 1,5 % y se cortó el ADN de aproximadamente 400 pb y se recogió del gel de agarosa. Se usó un kit de extracción de gel/PCR FastGene (Nippon Genetics Co., Ltd.) para recoger

el ADN del gel de agarosa. Después de la recolección del ADN, se realizó la secuenciación. La solución de secuenciación se preparó mezclando 100 ng de ADN molde, 3,75 µl de tampón de secuenciación, 1 µl de cebador 3,2 pmol y 0,5 µl de Big Dye, y se llenó hasta 20 µl con agua esterilizada. El cebador utilizado fue el cebador directo descrito anteriormente de la SEQ ID NO: 7. Después de la reacción, el ADN se purificó mediante un kit de purificación BigDye X Terminator^(R) (Applied Biosystems) y análisis de secuencias realizado mediante un analizador genético Applied Biosystems^(R) 3500xL.

Como resultado, una comparación de la secuencia analizada del Micro-Tom de tipo natural y la del MicroTom mutante confirmó que CCA en la secuencia de nucleótidos del Micro-Tom de tipo natural estaba mutado a CAA en la secuencia de nucleótidos del Micro-Tom mutante, como en el ejemplo 6. Además, se encontró que la secuencia analizada de cada una de las variedades comerciales era idéntica a la secuencia analizada del Micro-Tom de tipo natural. En otras palabras, la secuencia de nucleótidos de un sitio correspondiente a la mutación fue CAA en todas las variedades comerciales. La figura 9 resume los resultados. La secuencia analizada del Micro-Tom de tipo natural y las variedades comerciales se expone en la SEQ ID NO: 9, y la secuencia analizada del Micro-Tom mutante se expone en la SEQ ID NO: 10.

Los resultados anteriores confirmaron que la mutación partenocárpica descrita anteriormente que se encuentra en el gen de ciclina F-box del Micro-Tom mutante es una mutación inducida por el tratamiento con EMS. Dado que la secuencia analizada de las variedades comerciales era un 100 % idéntica a la secuencia analizada del Micro-Tom de tipo natural, se demostró además que la mutación inductora de partenocarpia descrita anteriormente puede introducirse en otras variedades de tomate.

[Ejemplo 8] Obtención del mutante del gen de ciclina F-box

Se sembraron semillas M2 de aproximadamente 9000 cepas mutagenizadas con EMS de tomate producidas de la misma manera que en el Ejemplo 1 a razón de 10 semillas cada una en suelo de cultivo y se cultivaron. El ADN se extrajo colectivamente de un grupo de individuos vegetales cultivados por cada cepa mediante métodos convencionales. El ADN extraído (ADN M2) se dividió en una placa de 96 pocillos y se almacenó a -20 °C. Seguidamente, se combinaron ADN M2 de 8 cepas cada uno y se dividieron en una nueva placa de 96 pocillos para preparar grupos de ADN. Los grupos de ADN preparados de aproximadamente 9000 cepas se usaron para la selección de mutantes mediante la selección de lesiones locales inducidas en los genomas (TILLING, *Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*). La selección de mutantes por TILLING se realizó básicamente de acuerdo con el método descrito en Okabe *et al.* (2011) *Plant and Cell Physiology* 52: 1994-2005, seleccionando así una cepa que tiene una mutación en el gen de ciclina F-box (Solyc01g095370). Específicamente, la PCR se realizó utilizando cebadores directos e inversos específicos del gen de ciclina F-box, que se marcaron en 5' con diferentes colorantes fluorescentes, y ADN de los grupos de ADN descritos anteriormente como molde, para amplificar una región diana en el gen de ciclina F-box. La Tabla 2 indica los cebadores directos e inversos específicos del gen de ciclina F-box usados en el presente documento.

Tabla 2

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Observaciones
F-box-TILL 1-2-Fw	ccacagccttaggttgagg (SEQ ID NO: 11)	extremo 5', marcador fluorescente Dy-681
F-box-TII,L1-2-Rev	acggtctgggttcccaatcc (SEQ ID NO: 12)	extremo 5', marcador fluorescente Dy-781
F-box-TILL2-2-Fw	gcattggctatctgtgcaaaca (SEQ ID NO: 13)	extremo 5', marcador fluorescente Dy-681
F-box-TILL2-2-Rev	agacaactgtccctgtcttgg (SEQ ID NO: 14)	extremo 5', marcador fluorescente Dy-781

A continuación, el producto de PCR obtenido se calentó y enfrió para potenciar la formación de un heterodúplex. Seguidamente, los ácidos nucleicos calentados y enfriados se trataron con una nucleasa SIENDO1 recombinante para escindir un sitio de emparejamiento incorrecto de nucleótidos en el heterodúplex formado. La nucleasa SIENDO1 recombinante se extrajo y se purificó de un tomate transgénico que sobreexpresaba SIENDO1, en el que el vector binario pGWB8 (Nakagawa *et al.* (2007) *J. Biosci. Bioeng.*, 104: 34-41) contenía el gen de la nucleasa SIENDO1 clonado (número de acceso AB667996). Los ácidos nucleicos tratados con la nucleasa SIENDO1 recombinante se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Si se observó un fragmento de escisión, se consideró que había una mutación. Por tanto, se seleccionaron las cepas indicadas para tener la mutación. Como cribado secundario, se realizó TILLING para cada cepa en el conjunto de ADN, incluidas las cepas indicadas para tener la mutación para seleccionar una cepa mutada. La mutación se identificó mediante análisis de secuencia.

Se sembraron semillas M3 de las cepas seleccionadas a razón de 20 semillas cada una en suelo de cultivo y se cultivaron. Entre los individuos vegetales cultivados, los individuos que tenían la mutación de forma homocigota se seleccionaron mediante genotipado usando TILLING. Específicamente, el ADN se extrajo de cada uno de los individuos vegetales mediante métodos convencionales. A continuación, se prepararon y sometieron a genotipificación dos tipos de muestras de ácido nucleico molde, en concreto, un molde de PCR utilizado para la detección de heterocigotos que comprende ADN del individuo vegetal solo, y un molde de PCR utilizado para la detección de homocigotos/heterocigotos en el que el ADN del individuo vegetal se combinaba con el ADN de tipo natural. Se amplificó una región diana del gen de ciclina F-box por PCR de la manera mencionada anteriormente, y el producto de PCR obtenido se calentó y enfrió para potenciar la formación de un heterodúplex. El producto resultante se escindió en el sitio de emparejamiento incorrecto de nucleótidos del heterodúplex con la nucleasa SIENDO1 recombinante y luego se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y se observó la presencia o ausencia de un fragmento de escisión. En caso de encontrarse un fragmento de escisión solo en el caso de usarse el molde de PCR anterior en el que el ADN del individuo vegetal se combina con el ADN de tipo natural y no encontrarse un fragmento de escisión en el caso de usarse el molde de PCR anterior que comprende ADN del individuo vegetal solo, se determinó que el genotipo de la cepa de prueba era homocigoto. Se determinó la secuencia de nucleótidos de la región amplificada del gen de ciclina F-box en la cepa mutante que se determinó que era homocigótica y se comparó con la secuencia de nucleótidos de la región correspondiente en el gen de ciclina F-box (SEQ ID NO: 1) de la cepa de tipo natural, identificando así una mutación genética. Los cebadores dCAPS se diseñaron teniendo en cuenta la mutación genética identificada, de modo que dieran lugar a productos de amplificación que se caracterizaban porque un producto de PCR obtenido en la cepa de tipo natural se digería con una enzima de restricción particular que reconocía el sitio de mutación, mientras que un producto de PCR obtenido en una cepa mutante no se digería con la misma enzima de restricción. El gen de ciclina F-box de la cepa mutante se amplificó usando los cebadores dCAPS y se escindió con una enzima de restricción que reconocía el sitio de la mutación, para confirmar la mutación genética y el genotipo. Se indujo la fructificación en individuos vegetales (M3) que se confirmó que eran mutantes homocigóticos de la misma manera que en el Ejemplo 3 y se determinaron los valores Brix (contenido de azúcar) de los frutos resultantes (frutos rojos maduros) utilizando un refractómetro portátil N-20E (ATAGO). Se recogieron semillas (semillas M4) de los individuos mutantes homocigóticos.

Como resultado, se aislaron dos cepas, cada una de las cuales tenía una mutación sin sentido en el gen de ciclina F-box y mostraba un alto contenido de azúcar en la generación M3. Estas cepas mutantes, W283 y W3583, tenían una sustitución de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del gen de ciclina F-box, lo que provoca una sustitución no conservativa de aminoácido. Específicamente, la cepa W283 tenía una mutación que provoca una sustitución de glicina en la posición 301 de la proteína ciclina F-box (SEQ ID NO: 2) por arginina (una sustitución de guanina en la posición 901 de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 por adenina). La cepa W3583 tenía una mutación que provoca una sustitución de serina en la posición 37 de la proteína ciclina F-box (SEQ ID NO: 2) por leucina (una sustitución de citosina en la posición 110 de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 por timina).

Los cebadores dCAPS utilizados para la confirmación de las mutaciones genéticas y los genotipos de las cepas W283 y W3583 fueron los descritos a continuación.

Tabla 3

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Enzima que reconoce el sitio de mutación
W283-dCAPS-Fw	ttctggaacaatgaagtgggtg (SEQ ID NO: 15)	SsaXI
W283-dCAPS-BsaXI-Rev	ccttaattatgtcaggacggtctggttcacaatcc (SEQ ID NO: 16)	
W3583-dCAPS-Xspl-Fw	ttcattttcagagcttaatatgaagaaaatagagaggctccc (SEQ ID NO: 17)	Xspl
W3583-dCAPS-Rev	tgaatgcaaggagggtcaatact (SEQ ID NO: 18)	

Se midieron los valores Brix (contenido de azúcar) para frutos polinizados (frutos rojos maduros) de las cepas W283 y W3583, y se compararon con los valores Brix medidos de la misma manera para frutos polinizados (frutos rojos maduros) del tipo natural y frutos polinizados (frutos rojos maduros) de la cepa E8986 obtenida en el Ejemplo 1. La Tabla 4 y la figura 10 muestran los resultados de la comparación. La Tabla 4 y la figura 10 también muestran el peso medio por fruto de frutos polinizados obtenidos para cada cepa.

Tabla 4

	Tipo natural (TN)	E8986	W283	W3583
Valor Brix*	5,7 ± 0,1	7,0 ± 0,1	9,1 ± 0,3	8,5 ± 0,3
Peso del fruto (g/fruto)*	4,5 ± 0,2	4,5 ± 0,3	3,7 ± 0,3	3,2 ± 0,1
* Media ± Error típico (ET)				

Las cepas W283 y W3583 tenían un contenido de azúcar más alto que el de la cepa de tipo natural y su alto contenido de azúcar también era mayor que el contenido de azúcar de la cepa E8986. La cepa E8986 también tenía un contenido de azúcar más alto que el de la cepa de tipo natural. Los resultados mostraron que una sustitución no conservativa en la proteína ciclina F-box es capaz de aumentar (mejorar) el contenido de azúcar en el fruto.

Adicionalmente, la cepa W283 tenía una morfología foliar particularmente característica y presentaba una anomalía morfológica foliar más fuerte que la anomalía de la cepa E8986 (figura 11). Por el contrario, la cepa W3583 presentaba una anomalía morfológica foliar en un nivel relativamente débil y no tenía partenocarpia (tasa partenocárpica del 0 %).

Las secuencias de nucleótidos de los genes de ciclina F-box mutantes de las cepas W3583 y W283 se exponen en la SEQ ID NO: 19 y 21, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de las proteínas ciclina F-box mutantes codificadas por las secuencias se exponen en la SEQ ID NO: 20 y 22, respectivamente.

Aplicabilidad industrial

La planta (p. ej., tomate) de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para producir frutos con alto contenido de azúcar de manera fácil y estable sin necesidad de métodos de cultivo e instalaciones especiales para lograr un alto contenido de azúcar en los frutos. La planta de acuerdo con la presente invención también se puede utilizar como material de reproducción para producir una planta partenocárpica o una planta productora de frutos con alto contenido de azúcar. Es posible prevenir la reducción de los rendimientos de los frutos o el deterioro de la calidad en el cultivo durante el verano y el invierno con el uso de la planta partenocárpica de acuerdo con la presente invención, lo que permite producir frutos de alta calidad durante todo el año.

Texto independiente del listado de secuencias

- SEQ ID NO: 1: Secuencia CDS que codifica la proteína ciclina F-box de tipo natural
 SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácidos de la proteína ciclina F-box de tipo natural
 SEQ ID NO: 3: Secuencia CDS que codifica la proteína ciclina F-box mutante (de E8986)
 SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácidos de la proteína ciclina F-box mutante (de E8986)
 SEQ ID NO: 5 a 8: Cebadores
 SEQ ID NO: 9: Secuencia analizada del Micro-Tom de tipo natural
 SEQ ID NO: 10: Secuencia analizada del Micro-Tom mutante (E8986)
 SEQ ID NO: 11 a 18: Cebadores
 SEQ ID NO: 19: Secuencia CDS que codifica la proteína ciclina F-box mutante (de W3583)
 SEQ ID NO: 20: Secuencia de aminoácidos de la proteína ciclina F-box mutante (de W3583)
 SEQ ID NO: 21: Secuencia CDS de codificación de la proteína ciclina F-box mutante (de W283)
 SEQ ID NO: 22: Secuencia de aminoácidos de la proteína ciclina F-box mutante (de W283)

REIVINDICACIONES

1. Una tomatara partenocárpica que tiene un gen de ciclina F-box mutante que confiere partenocarpia al tomate y codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 95 % o mayor con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que comprende una sustitución de prolina en la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína ciclina F-box de la SEQ ID NO: 2 por glutamina.
2. La tomatara de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la tomatara tiene un contenido mejorado de azúcar en el fruto, que tiene un aumento estadísticamente significativo en comparación con una planta de tipo natural de la misma variedad o cepa que tiene el gen de ciclina F-box de tipo natural.
3. La tomatara de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el gen de ciclina F-box mutante codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
4. La tomatara de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la tomatara es una semilla o un fruto.
5. Un método para producir una tomatara partenocárpica, que comprende introducir mediante mutagénesis específica de sitio o mutagénesis aleatoria una mutación nucleotídica en un gen de ciclina F-box de una tomatara para generar un gen de ciclina F-box mutante que confiera partenocarpia al tomate y codifique una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia del 95 % o mayor con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que comprenda una sustitución de prolina de la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína ciclina F-box de la SEQ ID NO: 2 por glutamina.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la mutación nucleotídica se introduce mediante mutagénesis específica de sitio.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la tomatara tiene un contenido mejorado de azúcar en el fruto, que tiene un aumento estadísticamente significativo en comparación con una planta de tipo natural de la misma variedad o cepa que tiene el gen de ciclina F-box de tipo natural.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde el gen de ciclina F-box mutante codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
9. Un gen de ciclina F-box mutante aislado, que confiere partenocarpia al tomate y codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 95 % o mayor con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y comprende una sustitución de prolina de la posición 398 definida basándose en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 por glutamina.
10. El gen de ciclina F-box mutante aislado de la reivindicación 9, que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

Fig. 1

Tipo natural

Mutante



Fig. 2

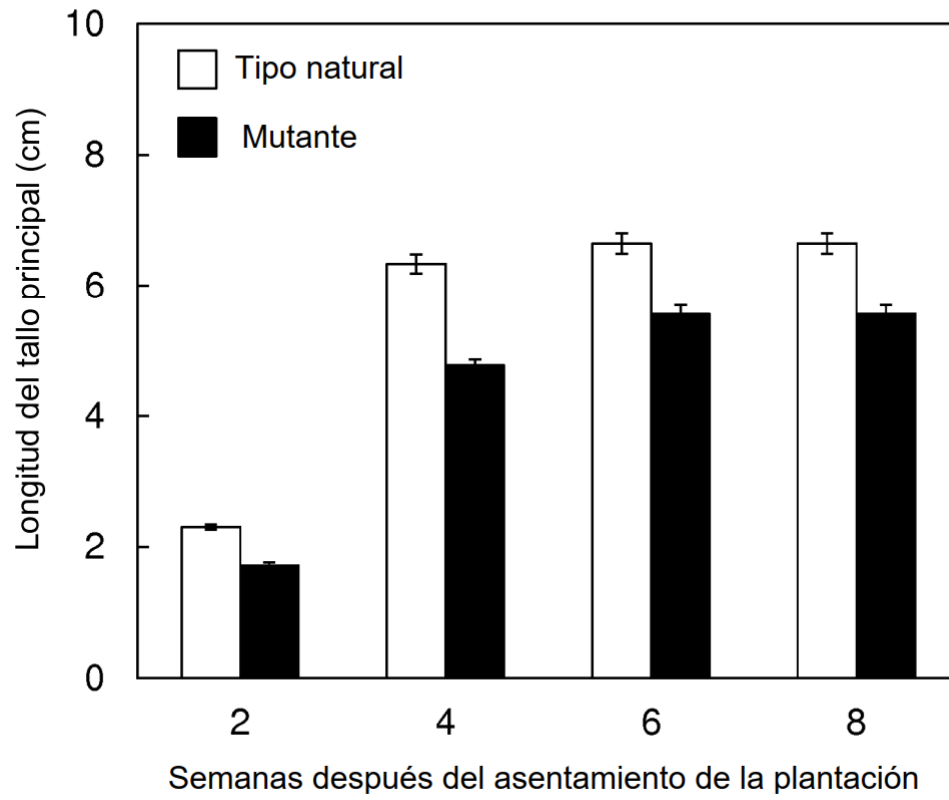


Fig. 3

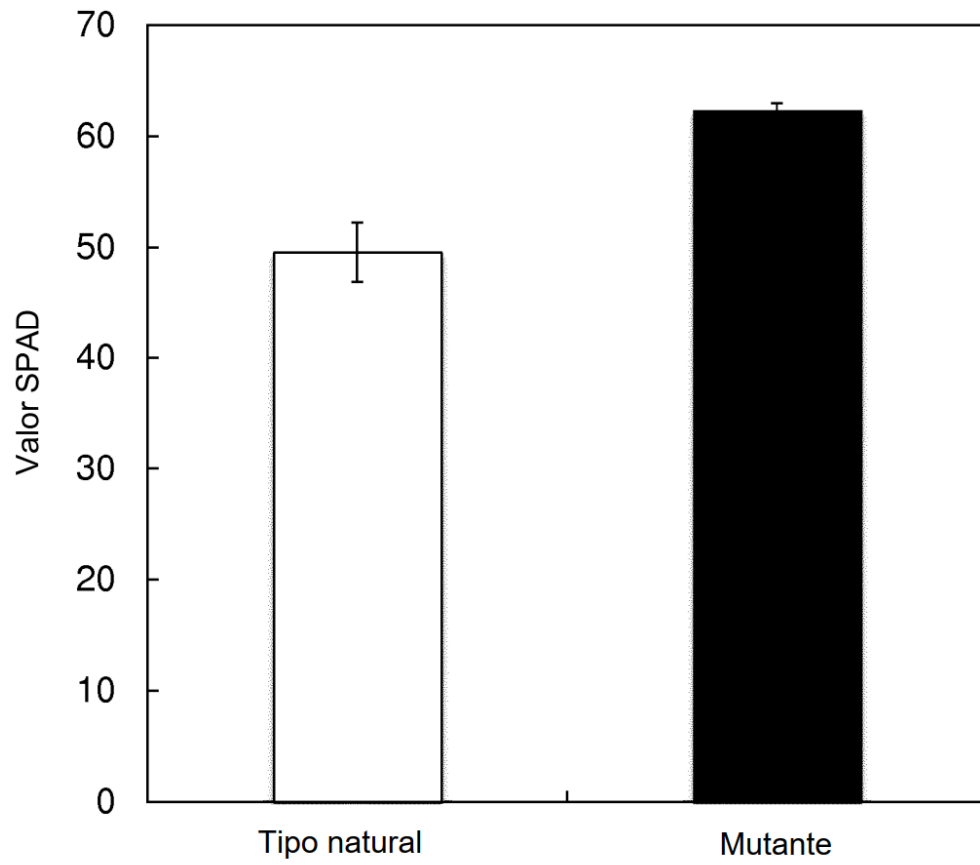


Fig. 4

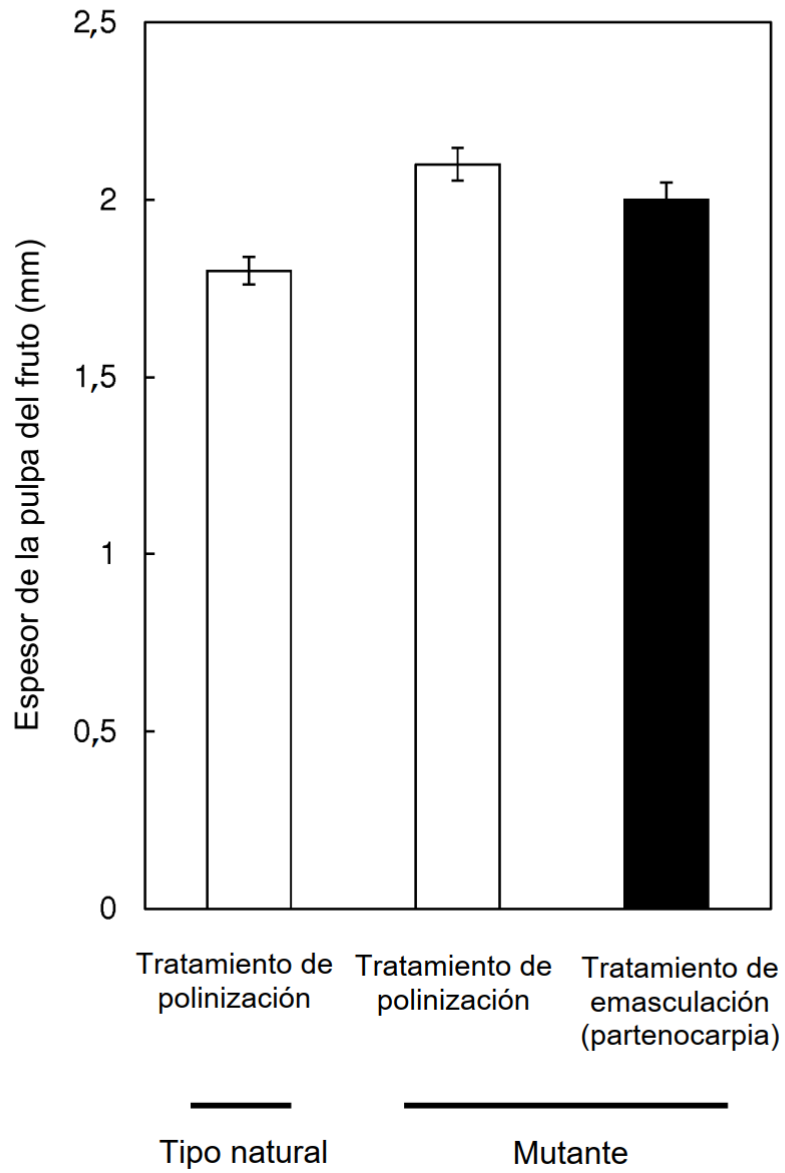


Fig. 5

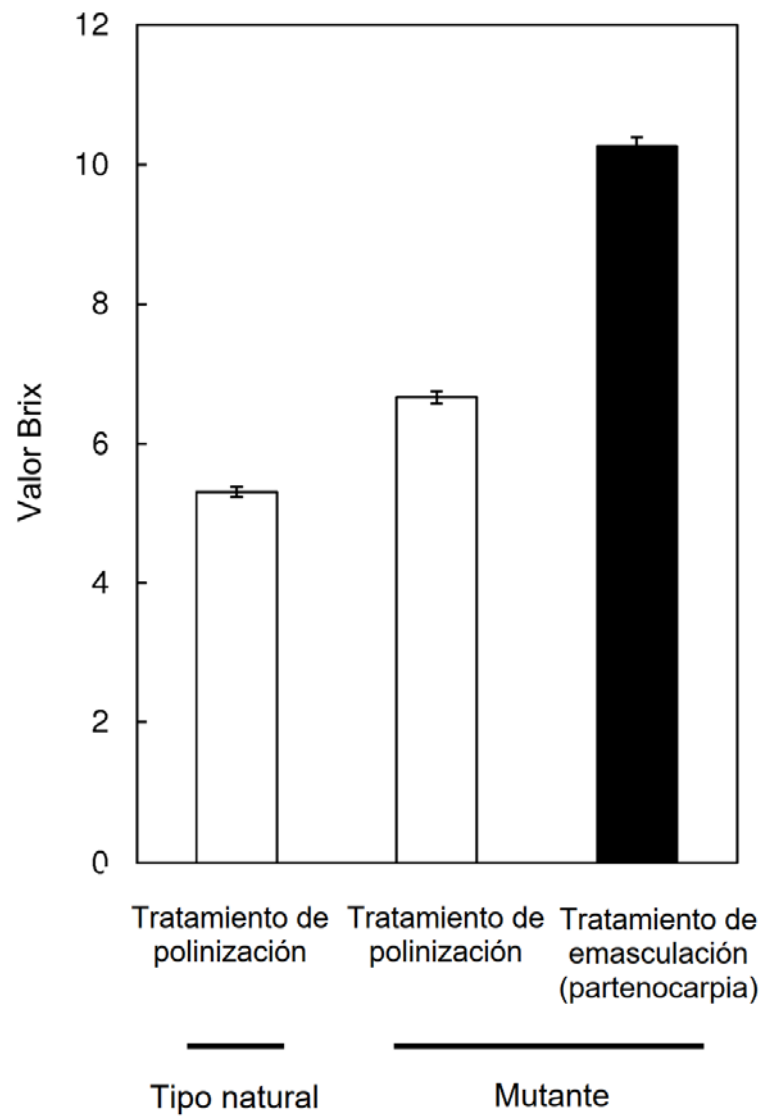
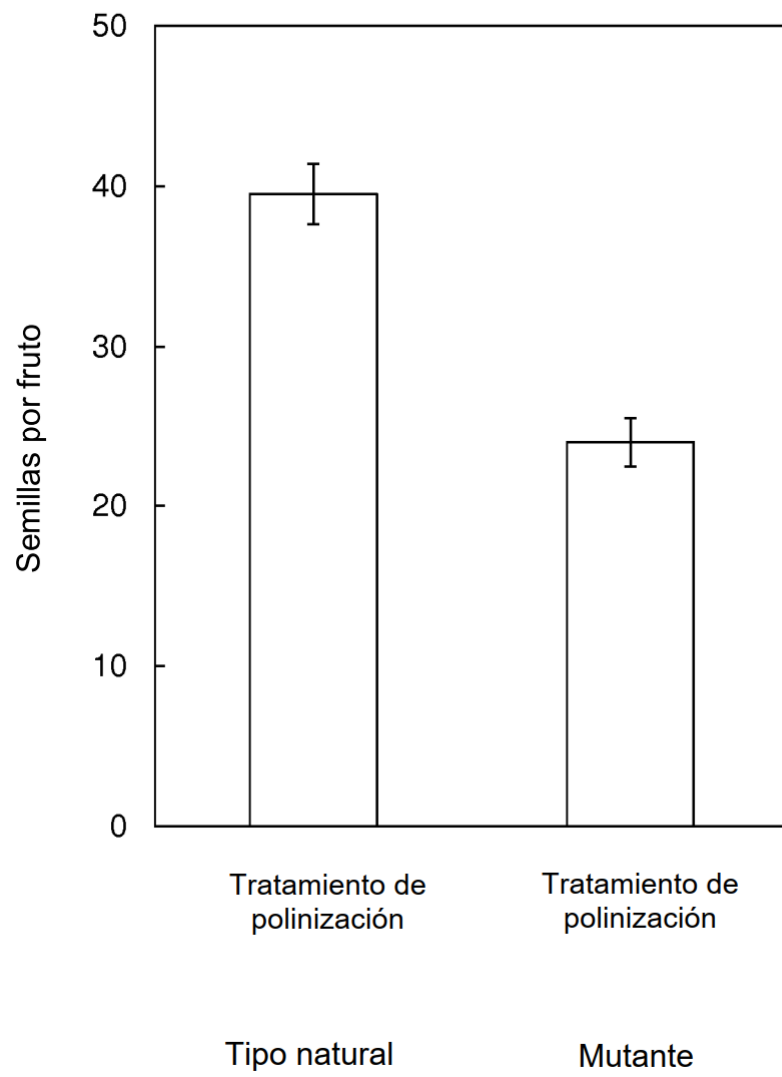


Fig. 6



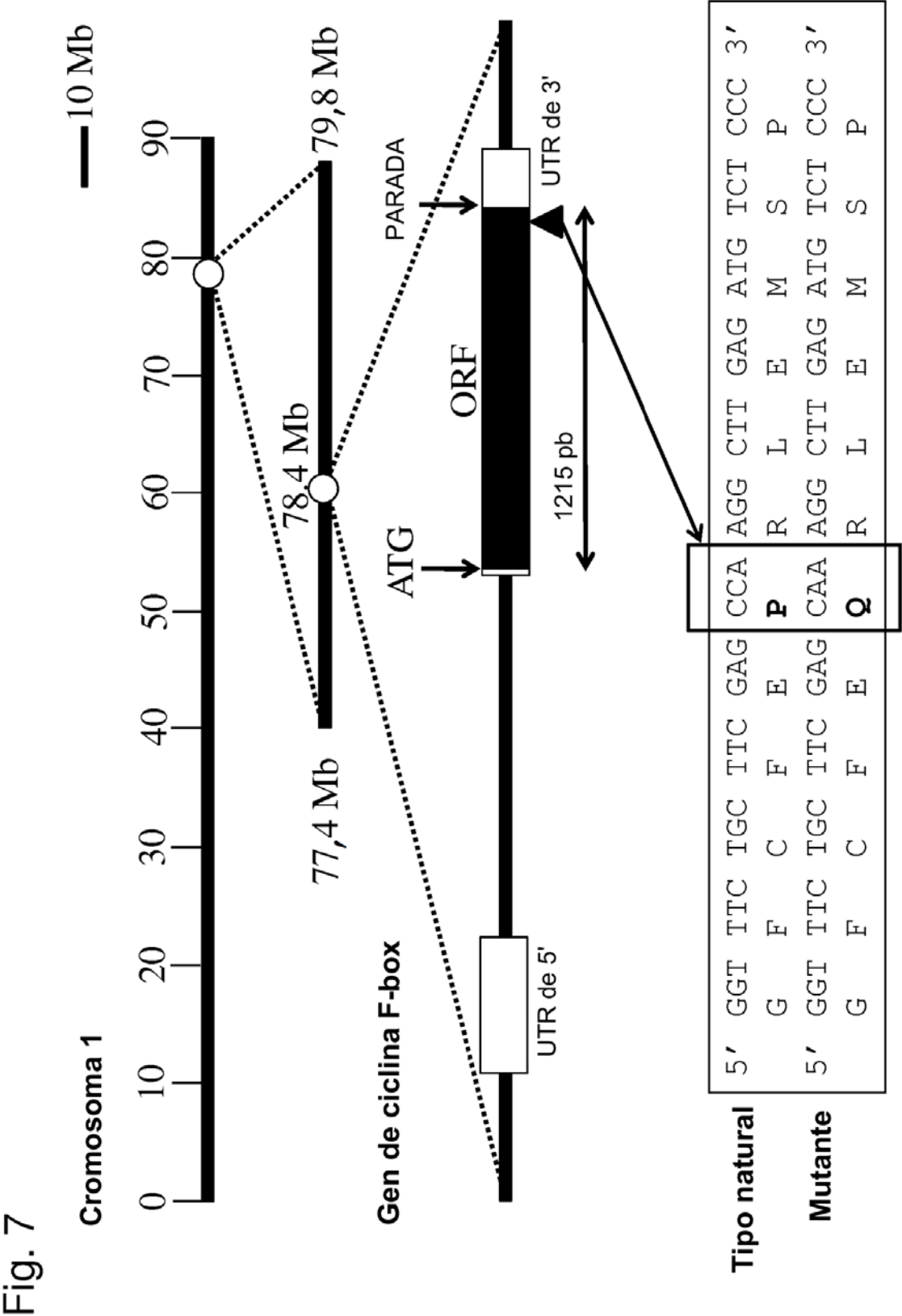
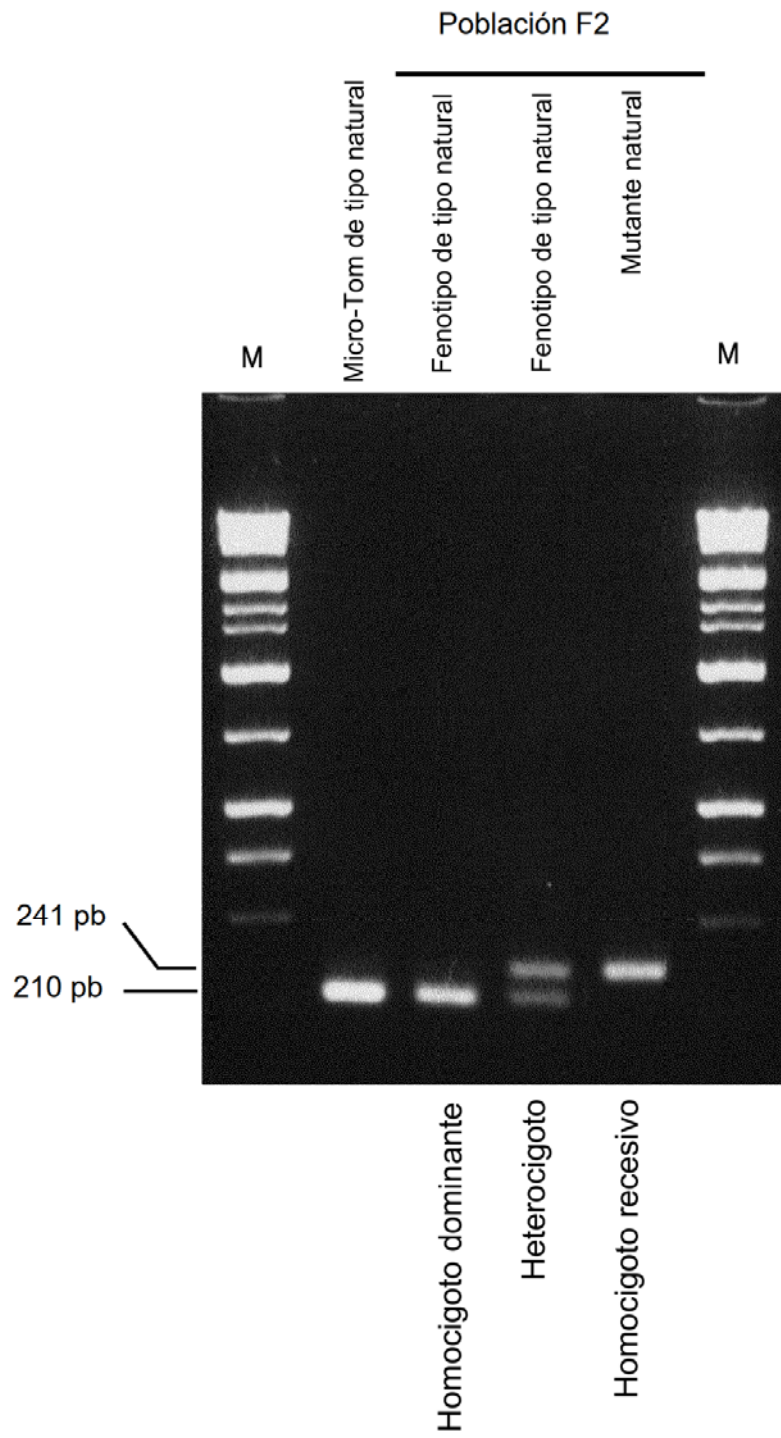


Fig. 8



Gen de ciclina F-box	UTR de 5'	ATG	ORF	UTR de 3'	PARADA								
Micro-Tom de tipo natural	GGT	TTC	TGC	TTC	TTC	GAG	CA	AGG	CTT	GAG	ATG	TCT	CCC
Micro-Tom mutante	GGT	TTC	TGC	TTC	TTC	GAG	AA	AGG	CTT	GAG	ATG	TCT	CCC
'Aichi First'	GGT	TTC	TGC	TTC	TTC	GAG	CA	AGG	CTT	GAG	ATG	TCT	CCC
'House Momotaro'	GGT	TTC	TGC	TTC	TTC	GAG	CA	AGG	CTT	GAG	ATG	TCT	CCC
'Zuiko 102'	GGT	TTC	TGC	TTC	TTC	GAG	CA	AGG	CTT	GAG	ATG	TCT	CCC
'Reiyon'	GGT	TTC	TGC	TTC	TTC	GAG	CA	AGG	CTT	GAG	ATG	TCT	CCC
'Reika'	GGT	TTC	TGC	TTC	TTC	GAG	CA	AGG	CTT	GAG	ATG	TCT	CCC
'Ailsa Craig'	GGT	TTC	TGC	TTC	TTC	GAG	CA	AGG	CTT	GAG	ATG	TCT	CCC
'Moneymaker'	GGT	TTC	TGC	TTC	TTC	GAG	CA	AGG	CTT	GAG	ATG	TCT	CCC
'M82'	GGT	TTC	TGC	TTC	TTC	GAG	CA	AGG	CTT	GAG	ATG	TCT	CCC
'Levanzo'	GGT	TTC	TGC	TTC	TTC	GAG	CA	AGG	CTT	GAG	ATG	TCT	CCC

Fig. 10

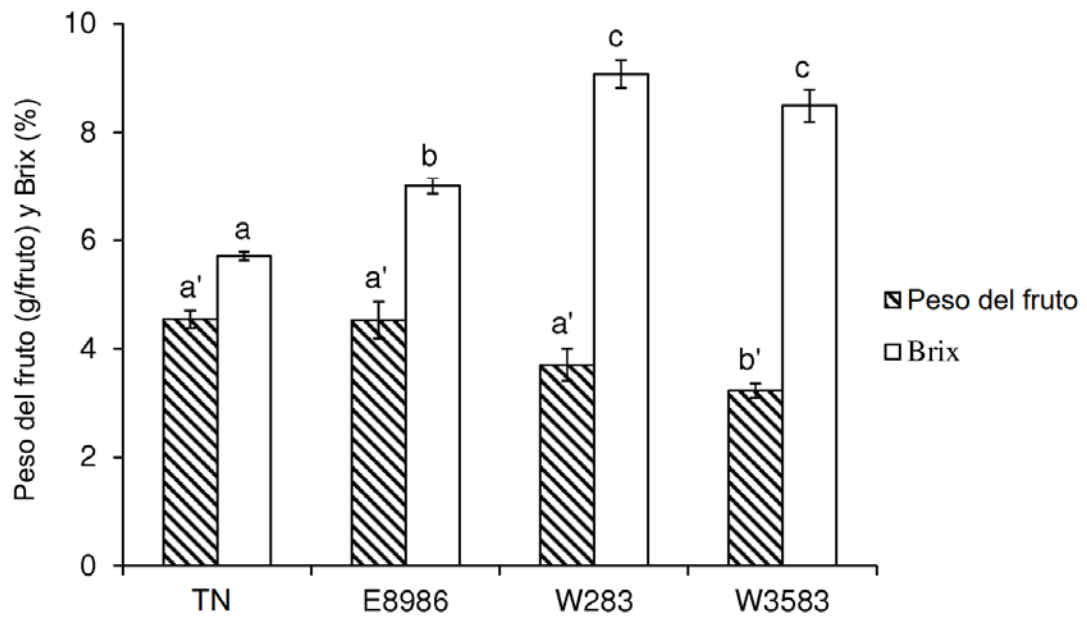


Fig. 11

