

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 937 266**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2016 PCT/IB2016/050060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2016 WO16110814**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2016 E 16707948 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2022 EP 3242944**

54 Título: **Variante alélica del gen Cyc-B para la constitución de variantes de tomate resistentes a orobanca**

30 Prioridad:

09.01.2015 IT MI20150009

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

27.03.2023

73 Titular/es:

**AGENZIA LUCANA DI SVILUPPO E DI
INNOVAZIONE IN AGRICOLTURA (ALSIA)**
(100.0%)

**Via Carlo Levi 6/I
75100 Matera (MT), IT**

72 Inventor/es:

**CARRIERO, FILOMENA y
CELLINI, FRANCESCO**

74 Agente/Representante:

MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 937 266 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

Variante alélica del gen Cyc-B para la constitución de variantes de tomate resistentes a orobanca

La presente invención se refiere a una variante alélica del gen Cyc-B, inducida artificialmente, para la constitución de variedades de tomate resistentes a la orobanca y a las variedades de tomate así obtenidas.

- 5 Las orobancas son malezas, que carecen de clorofila y de un sistema de raíces, que toman nutrientes y agua a expensas de la planta huésped que están parasitando. Pertenecen a la familia de las Orobanchaceae y más de 100 especies se incluyen en el género Orobanche, entre las que se encuentra la orobanca ramificada que prefiere las plantas solanáceas y es la especie más extendida en el territorio italiano.
- 10 La presencia de orobanca ramificada se ha incrementado significativamente en los últimos años y su creciente difusión en zonas dedicadas al cultivo de tomate industrial ha producido daños considerables tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo [1].
- 15 Las plantas de tomate parasitadas muestran inicialmente un crecimiento más o menos atrofiado seguido de una disminución cualicuantitativa de la producción, debido a una reducción en la capacidad de aprovechamiento de nutrientes y absorción de agua. La producción decreciente es extremadamente variable ya que depende de la duración de la parasitación: si se produce desde las primeras fases de crecimiento del tomate, obviamente es mayor, llegando hasta cerca del 40 % y en algunos casos incluso hasta el 75 % respecto a la producción obtenible sin infestación [2].
- 20 La nocividad de esta planta se debe principalmente a su capacidad de infestar rápidamente el terreno, reproduciéndose exponencialmente mediante la producción de cantidades altísimas de semillas (hasta 500.000 por planta) [3] que tiene pequeñas dimensiones (alrededor de 0.2-0.3 mm), cuya vitalidad en la tierra puede durar hasta doce años [4]. Debido a sus dimensiones, las semillas son dispersadas con mucha facilidad por el viento, el agua, los animales y la actividad humana mediante herramientas y máquinas agrícolas y, especialmente, mediante la recolección mecánica de tomates que se realiza cortando las plantas a ras de suelo donde también hay tallos de orobanca ([5]-[7]). Las cápsulas maduras liberan semillas, algunas de las cuales permanecen latentes mientras que otras, si son estimuladas por los exudados de las raíces de las plantas hospedantes, son capaces de germinar inmediatamente y crear nuevas plantas que emergen del suelo formando capullos florales (brotes).
- 25 Existe un gran interés en solucionar el problema de la orobanca debido al daño que provoca el parásito a nivel económico en el ámbito agrícola, la industria de transformación y en consecuencia también para el consumidor.
- 30 Se han utilizado numerosos enfoques para el control de la infección, consistentes en el uso de herbicidas, solarización, desinfección del suelo, rotaciones con trampas para plantas, labranza, fertilizantes nitrogenados, abonos, agentes de biocontrol y metabolitos secundarios administrados directamente al suelo o en compostas activadas ([6], [8]) pero ninguno de estos ha demostrado ser completamente efectivo.
- 35 Las investigaciones realizadas in situ sobre métodos de control aplicados individualmente han arrojado resultados sólo parciales o totalmente insatisfactorios, debido a la variabilidad de las condiciones climáticas de los diferentes ambientes ([9], [11]). El uso integrado de los métodos anteriores puede limitar el daño [12] con el objetivo de reducir progresivamente el "banco de semillas" del parásito en el suelo a un nivel de umbral mínimo [13].
- Un enfoque alternativo y/o complementario al utilizado actualmente para el control de la infección por orobanca en tomate es la mejora genética o la selección y uso de nuevos genotipos de tomate capaces de oponerse al ataque del parásito.
- El β -caroteno no sólo es un precursor de las β -xantofilas, sino que también es un sustrato de síntesis de la estrigolactona, hormona que ejerce diversas funciones en el ciclo de vida de la planta [14].
- 40 La estrigolactona se produce principalmente en las raíces y, de hecho, se puede encontrar tanto en los exudados como en los extractos de tejido de raíces de especies vegetales pertenecientes a monocotiledóneas y dicotiledóneas ([15]-[18]).
- A nivel de raíces, la estrigolactona actúa como señal para el desarrollo de micorrizas [19] y como estimulante para la germinación de la orobanca, un conocido parásito de numerosas especies vegetales [20], entre las que se encuentran los tomates.
- 45 La implicación de la estrigolactona en la susceptibilidad de las plantas de tomate a las infecciones por orobanca se confirma mediante diversos estudios en los que se demuestra que las líneas de tomate con bajo contenido en estrigolactona están menos sujetas a infecciones por orobanca.
- Como ya se mencionó, la estrigolactona deriva del β -caroteno y específicamente su sustrato de síntesis es el isómero 9-cis- β -caroteno.
- 50 En tomate, la síntesis de β -caroteno está catalizada por dos enzimas: licopeno beta ciclasa, Lcy-b, codificada por el gen CrtL-b [21], que se expresa y activa en las hojas, flores y frutos y licopeno beta ciclasa, Cyc-B, codificado por el gen Cyc-B, específico de cromoplastos, altamente expresado en los pétalos y también presente, en niveles bajos, en el fruto [22].

La solicitud de patente internacional WO2006/098626 describe un método para la producción de plantas, también tomates, resistentes a la infección por parte de orobanca mediante el silenciamiento o supresión de los genes pertenecientes a la ruta de los carotenoides, citando entre otros la fitoenosintasa, fitoenodesaturasa, carotenodesaturasa, isomerasa caroteno, licopeno ciclasa, β -caroteno hidroxilasa, zeaxantina epoxidasa, neoxantina sintasa, carotenoide dioxigenasa, 9-cis-epóxido carotenoide dioxigenasa, citocromo P450 hidroxilasa, epoxidasa, deshidrogenasa y desmetilasa.

En el trabajo de Kohlen W. et al., 2012 [23], en el que se modifica mediante la estrategia antisentido el nivel de expresión del gen CCD8 que codifica una enzima implicada en la síntesis de estrigolactona, se especifica que las líneas transgénicas de tomate con bajos niveles del transcrito CCD8 producen bajas cantidades de estrigolactona y tienen un 90 % de reducción de la infección por parte de la orobanca con respecto a sus contrapartes (plantas control) en las que no se ha modificado la expresión del gen CCD8.

El trabajo de Vogel T. J. et al., 2010 describe plantas de tomate obtenidas mediante el enfoque antisentido contra el gen diana CCD7, que son definitivamente más resistentes a la infección por parte de la orobanca, pero que paralelamente tienen características no deseadas para la reproducción.

En ambos casos, de hecho, un aumento de las ramificaciones de las plantas de tomate generadas con la estrategia antisentido se asocia con una reducción de la estrigolactona provocada por la desactivación de los dos genes CCD7 y CCD8 pertenecientes a la familia CCD (dioxigenasa de ruptura de carotenoides). Además, en el trabajo de Kohlen W. et al., 2012, además de un aumento de las ramificaciones, se indica que la desactivación del gen CCD8 también tiene consecuencias importantes sobre el sistema reproductivo, sobre el tamaño de las flores, de la cantidad de semillas, y por lo tanto de la fertilidad de las plantas antisentido así obtenidas.

El tomate mutante S1-ORT1, generado por mutagénesis física e identificado por su resistencia a las infestaciones de orobanca [24] tras el análisis bioquímico de los extractos de raíz, ha probado que produce pequeñas cantidades de las dos estrigolactonas presentes en los tomates, solanacol y didehidroorobancol, con respecto a su estricto control M82 [25]. Además de la característica "positiva" de resistencia a las infestaciones por parte de la orobanca, el mutante de tomate S1-ORT1, a nivel vegetativo, mostró, por otro lado, un aumento de las ramificaciones laterales con respecto al control. Esto confirma el papel de la estrigolactona en la regulación de la arquitectura de la planta y que ésta funciona a nivel vegetativo como supresor de la ramificación lateral. Sin embargo, aún se desconoce el gen responsable de la característica de resistencia al parásito orobanca en S1-ORT1.

Se han desarrollado nuevas tecnologías en apoyo de las tecnologías tradicionales en la última década, con el fin de aumentar la eficiencia del proceso de selección de características de interés.

TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes (lesiones locales dirigidas inducidas en genomas)) es una de estas nuevas tecnologías de mejoramiento genético.

El TILLING es un método que combina la mutagénesis química, ya muy utilizada en el pasado en la mejora genética de diversos cultivos, y conocimientos y técnicas biológicas avanzadas para aislar nuevas variantes alélicas (mutaciones) y por lo tanto nuevos genotipos que se pueden insertar, bastante rápidamente, en programas de constitución varietal [26].

Desde un punto de vista tecnológico, TILLING es una plataforma que desarrolla una colección de genotipos que pueden analizarse rápidamente para seleccionar características de interés, mediante análisis de ADN de alta eficiencia.

Usando esta tecnología, los autores de la presente invención ahora han inducido y aislado artificialmente una variante alélica del gen que codifica la enzima licopeno beta-ciclasa (Cyc-B) responsable de la conversión de licopeno a β -caroteno en la ruta de los carotenoides capaz de conferir a las plantas de tomate, el fenotipo de resistencia al parásito orobanca, dejando inalterada la morfología y funcionalidad del sistema reproductivo de la planta. En particular, el mutante de tomate así obtenido no presenta un aumento de ramificaciones laterales respecto al control, superando efectos no deseados sobre el desarrollo de la planta de los mutantes hasta ahora conocidos (SI-ORT1; CCD8, CCD7). Además, no se ha observado ninguna consecuencia negativa sobre el sistema reproductivo de la planta en cuanto a una reducción de las dimensiones de las flores, ni de las dimensiones y número de semillas por fruto de tomate. Estos efectos son evidentemente completamente inesperados considerando que la inactivación de otros genes de la ruta de los carotenoides conduce a un aumento en las ramificaciones e influye en el sistema reproductivo y por lo tanto en la eficiencia del proceso de reproducción.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención se refiere al uso de la variante alélica del gen que codifica la enzima licopeno beta-ciclasa (Cyc-B) (número de acceso de GenBank AF 254793) caracterizada por la presencia de la mutación con cambio de sentido en posición A949G, inducida mediante mutagénesis para seleccionar una planta de tomate mutada con un fenotipo de resistencia a infecciones por orobanca, en particular orobanca ramificada, donde dicha variante alélica consiste en la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 5).

La variante alélica se caracteriza por la presencia de una mutación puntual en la posición 949 de la secuencia que codifica el gen Cyc-B (A949G) que, a nivel de proteína, provoca un cambio de aminoácido en la posición 317, más específicamente el aminoácido básico Arginina (R) se sustituye por el aminoácido hidrofílico Glicina (G), (R317G).

A partir de un análisis comparativo con secuencias depositadas en bancos de datos, se demuestra que la variante alélica A949G del gen Cyc-B prueba no estar presente en la variabilidad natural de las plantas de tomate.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de tipo salvaje del cromoplasto de licopeno ciclasa específico (Cyc-B) de *Solanum lycopersicum* (SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO 7) tienen una identidad de secuencia en un nucleótido y un nivel de aminoácido igual a solo 58 % y 52 % con respecto a las correspondientes secuencias de tipo salvaje de la licopeno ciclasa (Lcy-b) de *Solanum lycopersicum* (número de acceso GenBank X86452.1, SEQ ID NO: 8 y UniProtKB/Swiss-Prot: Q43503, SEQ ID NO: 9). La Figura 1 ilustra la comparación entre las secuencias a nivel de nucleótidos y aminoácidos y los porcentajes relativos de identidad.

A este respecto, cabe señalar que la licopeno ciclasa Cyc-B de *Solanum lycopersicum* (SEQ ID NO: 7) tiene un porcentaje de identidad mucho mayor a nivel de aminoácidos (alrededor del 85 %) con la enzima capsantina/capsorubina sintasa (CCS) de pimientos (UniProtKB-Q42435, SEQ ID NO: 10), que, aunque es una enzima de la ruta de los carotenoides, no es una licopeno ciclasa (ver la comparación ilustrada en la Figura 2).

A nivel fenotípico, la mutación A949G del gen Cyc-B, presente en la línea mutante de tomate cyc-b7, provoca un aumento de licopeno en detrimento del β -caroteno [30].

En base a la hipótesis de que la reducción en la producción de β -caroteno en el tomate mutante cyc-b7 puede provocar una reducción de la estrigolactona y, en consecuencia, las plantas pueden tener una menor susceptibilidad a la infección por parte de la orobanca, la variante alélica de Cyc-B que tiene la mutación con cambio de sentido A949G, inducida artificialmente mediante mutagénesis, se evaluó durante dos años consecutivos en campos abiertos para determinar su susceptibilidad al ataque del parásito de la orobanca. En ambos ensayos, realizados en 2013 y 2014 en la zona de Foggia, donde el problema de la orobanca se siente fuertemente, éste mostró una buena resistencia al ataque de la orobanca ramificada. En términos productivos, la línea mutante cyc-b7 produjo un 10 % más de frutos con respecto a la línea de control (ver Ejemplo 2). Finalmente, la invención se refiere a un método de cribado para identificar una planta de tomate resistente a la orobanca, comprendiendo dicho método el análisis de una muestra de ADN de una planta de tomate de interés para detectar la presencia de al menos una mutación con cambio de sentido en la posición A949G del gen Cyc-B que consiste en SEQ ID NO: 5.

A continuación se describirá la presente invención, con fines ilustrativos, pero no limitativos, según algunas realizaciones preferidas con especial referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Las Figuras 1A y 1B muestran una comparación a nivel de nucleótidos y aminoácidos entre las secuencias de tipo salvaje de licopeno ciclasa Cyc-B (SEQ ID NO: 6-7) y Lcy-b (SEQ ID NO: 8-9) de *Solanum lycopersicum*;

- La Figura 2 muestra una comparación a nivel de aminoácidos entre las secuencias de tipo salvaje de capsantina/capsorubina sintasa (CCS) de pimientos (SEQ ID NO: 10) de *Solanum lycopersicum*;

- La Figura 3 muestra la estructura del gen Cyc-B producido con el uso del programa PARSESNP (<http://www.proweb.org/parsesnp/>). Se indica la posición de los fragmentos de PCR utilizados para el análisis molecular junto con su respectiva longitud. Los dos pares de cebadores específicos están representados por triángulos: los cebadores externos indicados con F1 y R1 y los cebadores internos indicados con F2 y R2;

- La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos de la variante alélica A949G del gen Cyc-B. La mutación puntual inducida artificialmente a través de mutagénesis química se indica en gris y en negrita. Los codones de inicio (ATG) y los codones de transducción STOP (TGA) se indican en la secuencia en negrita;

- La Figura 5 muestra las fotografías de las plantas mutantes cyc-b7 y plantas de control Red Setter en la prueba de campo de 2014. Los brotes secos de orobanca que son mucho más abundantes en el lote de la planta de control Red Setter, se pueden ver en las fotografías;

- La Figura 6 muestra la diferencia en el número de brotes observados entre el lote que alberga las plantas mutantes cyc-b7 y el de la línea de control Red Setter. Las fotografías fueron tomadas después de la remoción de las plantas.

Ejemplo 1: Aislamiento de la nueva variante alélica A949G del gen Cyc-B

Materiales y métodos

Plataforma TILLING de destilación de tomate Red Setter

Se utilizó la plataforma TILLING de la planta de tomate de Alsia-Centro Ricerche Metapontum Agrobios para el aislamiento de la nueva variante alélica del gen Cyc-B [27]. Esta plataforma se basa en una población mutante de tomate generada en el antecedente genético de cv Red Setter, una variedad de tomate industrial. La plataforma comprende 5221 muestras de ADN preparadas a partir de igual número de familias M3 de la colección de mutantes Red Setter.

Proyección y selección de los cebadores

La secuencia completa del gen Cyc-B (GenBank access no. AF 254793) de 1666 pb de longitud, compuesta por 169 pb de 3'UTR y 1497 pb de ORF (Open Reading Frame (Marco Abierto de Lectura)) que codifica un polipéptido de 498 aminoácidos (Figura 3), se recuperó en los bancos de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El gen Cyc-B es un gen de una sola copia y no tiene intrones.

- 5 Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos específicos de genes utilizados en la PCR anidada para el cribado TILLING en función de la secuencia: un par de oligonucleótidos externos que producen una amplificación de 1467 pb y un par de oligonucleótidos internos marcados en 5' con los fluoróforos IRDye 700 (cebador sentido) e IRDye 800 (cebador antisentido) que amplifican un fragmento de 1371 pb.

10 Los dos pares de cebadores se diseñaron usando el algoritmo Primer3, disponible en línea en el sitio <http://www.frodo.wi.mit.edu/primer3/> [28].

La Tabla 1 indica las secuencias de los cebadores, las temperaturas de hibridación de los pares de cebadores y las dimensiones de los amplicones usados en el cribado TILLING del gen Cyc-B.

Tabla 1

Cebador	Secuencia	T°C	Longitud amplificada
<i>PCR1</i>			
F1	5' GCTCTTCTCAAGCCTTTTCC 3' (SEQ ID NO: 1)	58°C	1467 bp
R1	5' GCCAAT CAGT CT AACCAAAGG 3' (SEQ ID NO: 2)		
<i>PCR2</i>			
F2	5' CCTCTCCTACACCCCATAGGT 3' (SEQ ID NO: 3)	57°C	1371 bp
R2	5' AGCCATGTCCGAAAAGACAC 3' (SEQ ID NO: 4)		

- 15 En la Figura 3 se muestra la porción del gen Cyc-B seleccionada para la búsqueda de mutaciones.

Análisis moleculares

La búsqueda de mutaciones útiles se realizó mediante PCR anidada. Para ello se utilizó el par de cebadores externos, denominados F1 (cebador sentido) y R1 (cebador antisentido) para efectuar la primera amplificación (PCR1) y el par de cebadores internos, denominados F2 (cebador sentido) y R2 (cebador antisentido) seleccionados para amplificar el producto de PCR1, ambos descritos en la Tabla 1.

La Tabla 1 indica las secuencias de los cebadores, las temperaturas de hibridación, los pares y las dimensiones de los amplicones utilizados en el cribado TILLING del gen Cyc-B. Ambos pares de oligonucleótidos se probaron en ADN genómico de cv Red Setter y en diversas muestras de la plataforma TILLING para definir las condiciones óptimas de amplificación.

- 25 Después de establecer las condiciones experimentales de la PCR anidada y, sobre todo, después de verificar que el producto obtenido con los dos pares de cebadores que consisten en una sola banda de ADN, se adquirieron los cebadores internos F2 y R2, respectivamente marcados en el Extremo terminal 5' con IRDye 700 e IRDye 800 que absorben y emiten fluorescencia en la región del infrarrojo cercano. El marcado de los cebadores internos es necesario para visualizar las mutaciones con un LI-COR DNA Analyzer 4300 (LI-COR Inc.2006; <http://www.licor.com>).

30 Todos los oligonucleótidos fueron suministrados por la empresa Eurofins MWG/Operon (Eberserg, Alemania). Para PCR1, en un volumen de 25 µl, se utilizaron 4 ng de ADN genómico como molde para la amplificación de una mezcla de reacción que contenía 10 pmoles de cebador F1 y R1, 5 mm de dNTP, Tris-HCl 10 mm (pH 8.8), MgCl₂ 1.5 mm, KCl 50 mm, Triton X-100 al 0.1 % y 1 Unidad de ADN polimerasa DyNAzyme (Finnzymes). Luego de un primer ciclo de desnaturalización a 94 °C por 3', el producto de amplificación fue producido con 35 ciclos cada uno comprendiendo un paso de desnaturalización a 94 °C, hibridación a 58 °C y síntesis a 72 °C por un tiempo igual a 30" para cada etapa, se usó 1 µl de PCR1 como molde para la amplificación en PCR2 en presencia de 5 pmoles de los cebadores marcados F2 y R2 y en las mismas condiciones experimentales que PCR1, excepto que se usó una temperatura de 57 °C para la hibridación.

El producto de PCR así obtenido se sometió a una fase de desnaturalización y reasociación para la formación de moléculas de ADN híbrido consistentes en un filamento de tipo salvaje y un filamento silenciado en presencia de la mutación en la región analizada. Las mutaciones puntuales se identificaron con el uso de la endonucleasa ENDO I (Serial Genetics) que reconoce las regiones no coincidentes de las moléculas de ADN heterodúplex. Las condiciones de digestión son las indicadas por Triques et al., 2007 [29]. Los productos de la digestión se separaron en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes utilizando el analizador de fragmentos Li-Cor 4300. Las imágenes TIFF en "escala de grises" de los canales 700 y 800, así como la imagen en RGB, que permite la visualización contemporánea de los dos fluorocromos, se analizaron utilizando el software Adobe Photoshop para la búsqueda de mutaciones puntuales.

Análisis de secuencia

La mutación identificada mediante el cribado de la plataforma TILLING se verificó mediante análisis de secuencia.

La plantilla para la reacción de secuencia se preparó mediante PCR anidada utilizando los dos pares de cebadores adoptados para el cribado molecular de TILLING. En este caso, sin embargo, se utilizaron cebadores no marcados para la PCR2.

Se usaron alrededor de 15-20 ng de producto de PCR anidada para la reacción de secuencia efectuada en un volumen total de 20 µl usando el kit Big Dye Terminator V.3.1 (Applied Biosystem, Forster City, CA, EE. UU.) y el protocolo proporcionado por el distribuidor del kit. Después de la purificación en columnas Sephadex G50 Fine, efectuada para eliminar los nucleótidos y los cebadores no incorporados durante la reacción, los productos de secuencia se analizaron con el secuenciador capilar automático 3130 (Applera) y los cromatogramas se examinaron para detectar la presencia de mutación.

Resultados

Los oligonucleótidos seleccionados y específicos para el gen Cyc-B se utilizaron para el cribado molecular de la plataforma TILLING de tomate desarrollada en los laboratorios de Alsia-Centro Ricerche Metapontum Agrobios.

El análisis de las 5.221 muestras de ADN organizadas en grupos de 8 permitió identificar 9 mutaciones puntuales en ocho líneas mutantes de tomate, ya que se encontraron dos sustituciones de nucleótidos en el mismo genotipo (Silletti et al. 2013). La identidad y posición exacta de las sustituciones de nucleótidos se verificó mediante análisis de secuencia. De las nueve mutaciones, tres resultaron ser silenciosas mientras que seis a nivel de proteína causaron un cambio de aminoácido.

Resultados del análisis de fenotipado y selección de genotipos de interés

De las seis mutaciones con cambio de sentido identificadas, tres se sometieron a análisis de fenotipado para estudiar el efecto del cambio de aminoácido en el fenotipo.

Entre estos, la variante alélica que, en la posición 949 de la secuencia que codifica el gen Cyc-B (Figura 4) tiene una guanina en lugar de adenina (A949G), mostró un fenotipo modificado con respecto a los controles utilizados en el análisis de fenotipado [30].

La secuencia de nucleótidos de la variante alélica A949G de Cyc-B es la siguiente:

```
ATGGAAGCTCTTCTCAAGCCTTTTCCATCTCTTTTACTTTCTCTCTACACCCC
ATAGGTCTATTTTCCAACAAAATCCCTCTTTTCTAAGTCCCACCACCAAAAAAAA
ATCAAGAAAATGTCTTCTTAGAAACAAAAGTAGTAACTTTTTGTAGCTTTCTT
GATTTAGCACCCACATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTTAACATCTCATGGGTTG
ATCCTAATTGGAATCGGGCTCAATTCGACGTGATCATTATCGGAGCTGGCCCTGC
TGGGCTCAGGCTAGCTGAACAAGTTTCTAAATATGGTATTAAGGTATGTTGTGT
GACCCCTTCACTCTCCATGTGGCCAAATAATTATGGTGTTTGGGTTGATGAGT
TTGAGAATTTAGGACTGGAAAATTGTTTAGATCATAAATGGCCTATGACTTGTGT
GCATATAAATGATAACAAAATAAGTATTTGGGAAGACCATATGGTAGAGTTAGT
AGAAAGAAGCTGAAGTTGAAATTGTTGAATAGTTGTGTTGAGAACAGAGTGAAGT
TTTATAAAGCTAAGGTTTGGAAAGTGGAACATGAAGAATTTGAGTCTTCAATTGT
```

TTGTGATGATGGTAAGAAGATAAGAGGTAGTTTGGTTGTGGATGCAAGTGGTTTT
GCTAGTGATTTTATAGAGTATGACAGGCCAAGAAACCATGGTTATCAAATTGCTC
ATGGGGTTTTAGTAGAAGTTGATAATCATCCATTTGATTTGGATAAAATGGTGCT
TATGGATTGGAGGGATTCTCATTTGGGTAATGAGCCATATTTAAGGGTGAATAAT
GCTAAAGAACCAACATTCTTGATGCAATGCCATTTGATAGAGATTTGGTTTTCT
TGGAAGAGACTTCTTTGGTGAGTCGTCCTGTTTTATCGTATATGGAAGTAAAAAG
AAGGATGGTGGCAGGATTAAGGCATTTGGGGATCAAAGTGAAAAGTGTTATTGAG
GAAGAGAAATGTGTGATCCCTATGGGAGGACCACTTCCGCGGATTCCTCAAAATG
TTATGGCTATTGGTGGGAATTCAGGGATAGTTCATCCATCAACAGGGTACATGGT
GGCTAGGAGCATGGCTTTAGCACCAGTACTAGCTGAAGCCATCGTCGAGGGGCTT
GGCTCAACAAGAATGATAAGAGGGTCTCAACTTTACCATAGAGTTTGAATGGTT
TGTGGCCTTTGGATAGAAGATGTGTTAGAGAATGTTATTCATTTGGGATGGAGAC
ATTGTTGAAGCTTGATTTGAAAGGGACTAGGAGATTGTTTGACGCTTTCTTTGAT
CTTGATCCTAAATACTGGCAAGGGTTCCTTTCTTCAAGATTGTCTGTCAAAGAAC
TTGGTTTACTCAGCTTGTGTCTTTTCGGACATGGCTCAAACATGACTAGGTTGGA
TATTGTTACAAATGTCCTCTTCCTTTGGTTAGACTGATTGGCAATCTAGCAATA
GAGAGCCTTTGA (SEQ ID NO: 5) .

5 Más específicamente, la sustitución del nucleótido A949G, provocó la presencia inusual de licopeno en los pétalos de las plantas de tomate y una reducción de las β -xantofilas, derivadas del β -caroteno, mientras que provocó una acumulación de licopeno en la fruta madura [30].

La presencia de licopeno en los pétalos y el aumento de licopeno en el fruto se explica por el efecto deletéreo que tiene la mutación con cambio de sentido A949G del gen *Cyc-B* sobre la capacidad de la licopeno beta ciclasa de convertir el licopeno en β -caroteno, es decir, debido al cambio de aminoácido, R317G, la ciclasa convierte efectivamente el licopeno en β -caroteno con respecto a la enzima de tipo salvaje.

10 El aumento de licopeno en detrimento del β -caroteno se observó en el fruto de las plantas mutantes (línea mutante *cyc-b7*) cultivadas tanto en condiciones controladas como en campo abierto.

Ejemplo 2: Pruebas comparativas en campo abierto

Materiales y métodos

Reproducción de las plantas

15 En la evaluación en campo abierto, las plantas de la línea mutante *cyc-b7* que tienen la mutación A949G en el gen *Cyc-B* se compararon con el Red Setter de línea control y con las líneas comerciales de tomate Dres F1 y Progress.

Las semillas de la línea *cyc-b7* y Red Setter se colocaron primero en mesetas de poliestireno para germinar a una temperatura de aproximadamente 20-25 °C y las plántulas en una etapa de 4-6 hojas se trasplantaron luego en campos. Las plántulas de Dres F1 y Progress, por otro lado, se compraron en un invernadero.

20 Se evaluó la capacidad de resistencia del genotipo *cyc-b7* al parásito de la orobanca durante dos años consecutivos utilizando plantas de la generación M5 en el año 2013, y plantas de la generación M6 en el año 2014.

La reproducción de las plantas *cyc-b7*, que fueron un total de 30, tuvo lugar en un campo de producción industrial de tomate de la variedad comercial Dres F1. Las pruebas de campo se prepararon en la zona de Foggia.

A continuación, se evaluó la naturaleza de *cyc-b7* de resistencia al parásito por comparación con el Red Setter de línea de control no mutagenizada y con Dres F1.

Cuando las plantas alcanzaron la etapa de maduración de la fruta, se comprobó la presencia de la infección, es decir, se contaron los brotes en un número comparable de plantas pertenecientes a los tres genotipos que se estaban cultivando.

5 Resultados

Primera evaluación en campo abierto de la susceptibilidad de la línea *cyc-b7* a la infección por parte de la orobanca

Los datos obtenidos en las tres mediciones del nivel de infección por parte de orobanca en los tres genotipos de tomate Red Setter, *cyc-b7*, Dres F1 analizados en la prueba de campo del año 2013 se indican en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Genotipo	Número de plantas analizadas	Estudio I 31-07-2013	Estudio II 07-08-2013	Estudio III 26-08-2013
<i>Red Setter</i>	7	27*	35*	8*
<i>cyc-b7</i>	7	2*	1*	1*
Dres F1	16	134*	66*	26*
* Número de brotes de orobanca				

Como se puede observar, desde el primer estudio, la línea *cyc-b7*, que tiene la variante alélica A949G del gen *Cyc-B*, presentó un número muy bajo de brotes de orobanca con respecto a la línea comercial Dres F1 y el Red Setter de línea de control.

Los datos obtenidos indican que el genotipo mutante es capaz de resistir y oponerse al parásito en condiciones de alto ataque como se puede apreciar por el significativo número de brotes en la línea Dres F1 en el primer estudio.

Los resultados de este primer ensayo, realizado en el verano de 2013, aunque producido en un número muy pequeño de plantas, parecen confirmar nuestra hipótesis sobre la correlación entre una reducción en el contenido de β -caroteno y por lo tanto estrigolactona y una menor susceptibilidad a la infección por parte de Orobancha en el mutante *cyc-b7*.

Segunda evaluación en campo abierto de la susceptibilidad de la línea *cyc-b7* a la infección por parte de la orobanca

Los datos obtenidos en el experimento piloto de 2013 fueron sumamente alentadores para continuar con la evaluación del genotipo *cyc-b7* en condiciones de ataque del parásito.

De hecho, se preparó una nueva prueba de campo en el período de mayo-agosto de 2014, nuevamente en el área de Foggia donde el problema de la orobanca se siente fuertemente.

Se compararon plantas de la generación M6 de la línea *cyc-b7* con las plantas control Red Setter y la línea comercial Progress en un campo para la producción industrial de tomates (cv Progress).

En el ensayo de 2014, se utilizó un número extremadamente alto de plantas *cyc-b7* (alrededor de 100) en un proyecto experimental con réplicas biológicas.

Cuando las plantas alcanzaron la etapa de fructificación, se realizaron estudios sobre la presencia del parásito, más específicamente, se contaron los brotes en un número comparable de plantas pertenecientes a los tres genotipos Red Setter, *cyc-b7*, Progress in cultivo. Para cada genotipo, se comprobó la presencia del parásito en dos parcelas (repeticiones biológicas), cada una de 18 plantas de tomate. Se realizaron un total de tres estudios. La Tabla 3 indica el número de brotes de orobanca por parcela encontrados en los tres genotipos de tomate en el ensayo de campo preparado en el año 2014. Para cada genotipo, el estudio se efectuó en dos parcelas de 18 plantas cada una.

Tabla 3

Genotipo	Número de plantas analizadas por parcela	Estudio I 02-07-2014	Estudio II 24-07-2014	Estudio III 05-08-2014
<i>Red Setter</i>	18 18	7* 19*	55* 185*	107* 89*
<i>cyc-b7</i>	18 18	2* 0*	16* 8*	29* 12*

<i>Progress</i>	18 18	16* 23*	153* 102*	105* 89*
-----------------	----------	------------	--------------	-------------

Como se puede observar en la Tabla 3, en el primer estudio, la línea *cyc-b7*, que tiene la variante alélica A949G del gen *Cyc-B*, mostró un número muy bajo de brotes de orobanca, concretamente dos en una parcela y cero en la otra, con respecto a la línea comercial *Progress* (16 y 23 brotes) y el *Red Setter* de línea de control (7 y 19 brotes).

- 5 En el segundo estudio, el número total de brotes en las dos parcelas de *cyc-b7* es todavía bajo e igual a aproximadamente el 10 % de las líneas de control. De hecho, se registran 24 brotes en el mutante *cyc-b7* contra 240 y 255 revelados respectivamente para *Red Setter* y *Progress*. La diferencia en el número de brotes en la línea mutante y dos genotipos control también queda marcada en el tercer estudio del 5 de agosto de 2014. *Cyc-b7*, de hecho, tiene una reducción del 80 % en el número de plantas parásitas con respecto a *Red Setter* y *Progress*.
- 10 La diferencia en el número de brotes observados entre la línea mutante *cyc-b7* y la línea *Red Setter* también está documentada por las fotografías mostradas en las Figuras 5 y 6.

- En la Figura 5, las fotografías muestran la presencia de orobanca en una parcela de la línea mutante *cyc-b7* y el genotipo *Red Setter* antes de la recolección del fruto del tomate. Tras la cosecha y retirada de las plantas, en las fotografías de la figura 6, es mucho más evidente la marcada diferencia en el número de brotes presentes en la parcela de la línea mutante y la de la línea control.
- 15

A partir de los datos obtenidos, se puede afirmar que el genotipo mutante *cyc-b7*, ante el ataque de orobanca, presenta una buena resistencia a la infección por parte del parásito.

- La característica de resistencia no es total, pero es compatible con el tipo de mutación presente en la variante alélica: una mutación con cambio de sentido que modula y no anula la actividad de la proteína como se esperaba, por ejemplo, de una mutación knock-out.
- 20

El fenotipo de resistencia observado en la línea mutante *cyc-b7* en el ensayo de 2013 se confirma ampliamente en el ensayo de campo de 2014 realizado con un mayor número de plantas mutantes y con un diseño experimental de réplicas biológicas.

- 25 Los datos producidos en los dos ensayos de campo muestran que la variante alélica A949G del gen *Cyc-B* según la invención puede utilizarse como instrumento de lucha contra las infestaciones de orobanca en plantas de tomate. Esto puede permitir la producción de tomates en zonas actualmente afectadas por el ataque del parásito.

Prueba de campo de 2014: datos de producción

En el ensayo de campo de 2014, además de un estudio sobre el nivel de infestación del parásito, se recogieron datos sobre la producción de los tres genotipos en presencia de ataque por parte de orobanca.

- 30 Los datos de producción para la línea mutante *cyc-b7* y las líneas de control *Red Setter* y *Progress* se tomaron en las mismas parcelas analizadas para detectar la presencia del parásito orobanca y se indican en la Tabla 4.

Los datos obtenidos para la línea mutante *cyc-b7* y las dos líneas de control son el resultado del promedio de 36 plantas para cada genotipo.

Tabla 4

Genotipo	Producción Kg/planta
<i>Red Setter</i>	3.4
<i>cyc-b7</i>	3.9
<i>Progress</i>	3.5

35

Como se puede observar del análisis de la Tabla 4, la planta del genotipo *cyc-b7* produjo una media de 3.9 Kg de frutos de tomate frente a los 3.4 y 3.5 Kg registrados para *Red Setter* y *Progress* respectivamente.

La línea mutante *cyc-b7* que tiene la variante alélica A949G del gen *Cyc-B*, en presencia de orobanca, produce por lo tanto más frutos con respecto a las dos líneas de control.

- 40 La diferencia observada en la producción del genotipo resistente y las líneas de control no es muy alta (alrededor del 10 %) y definitivamente se puede atribuir a un retraso en el ataque del parásito en las plantas de tomate registrado en la temporada de 2014 en la zona de pruebas de campo.

La reducción en términos cuantitativos de la producción de tomates depende mucho de la fase de desarrollo vegetativo en la que se parasita la planta: si el ataque se produce a partir de los primeros estadios de crecimiento del tomate, el daño es evidentemente mayor.

5 Además, visiblemente, la arquitectura y la morfología de las plantas cyc-b7 se mostraron inalteradas con respecto a las de las plantas de control, en particular con referencia a la presencia de ramificaciones laterales.

10 Los datos indicados anteriormente muestran que la variante alélica A949G de Cyc-B representa, por lo tanto, un valioso recurso genético que puede ser utilizado por los criadores y cultivadores de variedades como instrumento para luchar contra las infestaciones de orobanca, superando los efectos no deseados sobre el desarrollo de la planta. Como la mutación (variante alélica) no es más que un SNP, este puede usarse como marcador molecular y por lo tanto "seguirse", para facilitar y acelerar la inserción de la nueva característica también en otros antecedentes genéticos de tomates.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una secuencia de nucleótidos que codifica para la enzima licopeno beta-ciclasa Cyc-B caracterizada por la presencia de la mutación con cambio de sentido en la posición A949G, inducida mediante mutagénesis para seleccionar una planta de tomate mutada con un fenotipo de resistencia a infecciones por orobanca, donde dicha secuencia de nucleótidos consiste en SEQ ID NO: 5.
2. Uso de una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha infección es por orobanca ramificada.
3. Método de cribado para identificar una planta de tomate resistente a orobanca, dicho método comprende el análisis de una muestra de ADN de una planta de tomate de interés para la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica para la enzima licopeno beta-ciclasa Cyc-B caracterizada por la presencia de la mutación con cambio de sentido en la posición A949G que consiste en SEQ ID NO: 5.

A) Comparación en nivel de nucleótidos

[illegible]

Porcentaje de identidad Matriz - Clustal2.1

1: Lcy-b	100.00	58.29
2: Cyc-B	58.29	100.00

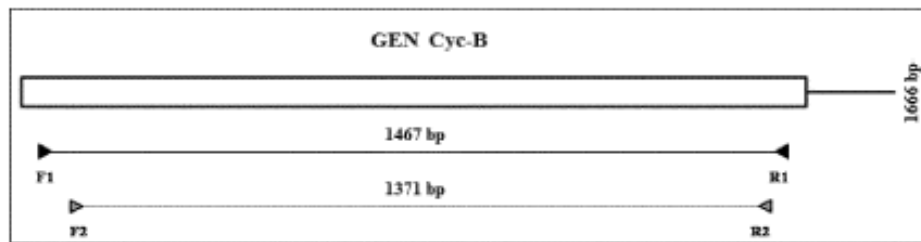


FIG. 3

ATGGAAGCTCTTCTCAAGCCTTTTCCATCTCTTTTACTTTCTCTCTACACCCCATAGG
TCTATTTTCCAACAAAAATCCCTCTTTTCTAAGTCCCACCACCAAAAAAATCAAGAAA
ATGTCCTCTTAGAAAAAAAAGTAGTAAACTTTTTGTAGCTTTCTTGATTTAGCACCCA
CATCAAAGCCAGAGTCTTTAGATGTTAACATCTCATGGGTTGATCCTAATTCGAATCGG
GCTCAATTCGACGTGATCATTATCGGAGCTGGCCCTGCTGGGCTCAGGCTAGCTGAAC
AAGTTTCTAAATATGGTATTAAGGTATGTTGTGTTGACCCTTCACCACTCTCCATGTGG
CCAAATAATTATGGTGTTTGGGTTGATGAGTTTGAGAATTTAGGACTGGAAAAATTGTTT
AGATCATAAATGGCCTATGACTTGTGTGCATATAAATGATAACAAAATAAGTATTTG
GGAAGACCATATGGTAGAGTTAGTAGAAAAGAAGCTGAAGTTGAAAATTGTTGAATAGTT
GTGTTGAGAACAGAGTGAAGTTTTATAAAGCTAAGGTTTGGAAAGTGGAACATGAAGA
ATTTGAGTCTTCAATTGTTTGTGATGATGGTAAGAAGATAAAGAGGTAGTTTGGTTGTGG
ATGCAAGTGTTTTGCTAGTGATTTATAGAGTATGACAGGCCAAGAAACCATGGTTAT
CAAATTGCTCATGGGGTTTTAGTAGAAGTTGATAATCATCCATTTGATTTGGATAAAAT
GGTGCTTATGGATTGGAGGGATTCTCATTTGGGTAATGAGCCATATTTAAGGGTGAATA
ATGCTAAAGAACCAACATTCTTGTATGCAATGCCATTTGATAGAGATTTGGTTTTCTTG
GAAGAGACTTCTTTGGTGAGTCGTCCTGTTTTATCGTATATGGAAGTAAAAAGAAGGA
TGGTGGCAAGGATTAAGGCATTTGGGGATCAAAGTGAAAAGTGTTATTGAGGAAGAGA
AATGTGTGATCCCTATGGGAGGACCACTTCCGCGGATTCCTCAAAATGTTATGGCTATT
GGTGGGAATTCAGGGATAGTTTCATCCATCAACAGGGTACATGGTGGCTAGGAGCATGG
CTTTAGCACCAAGTACTAGCTGAAGCCATCGTCGAGGGGGCTTGGCTCAACAAGAAATGAT
AAGAGGGTCTCAACTTTACCATAGAGTTTGGAAATGGTTTGTGGCCTTTGGATAGAAGAT
GTGTTAGAGAATGTTATTCATTTGGGATGGAGACATGTTGAAGCTTGATTTGAAAGGG
ACTAGGAGATTGTTTGACGCTTTCTTTGATCTTGATCCTAAATACTGGCAAGGGTTCTT
TTCTTCAAGATTGTCTGTCAAAGAACTTGGTTTACTCAGCTTGTGTCTTTTCGGACATGG
CTCAAACATGACTAGGTTGGATATTGTTACAAAATGTCCTCTTCCTTTGGTTAGACTGA
TTGGCAATCTAGCAATAGAGAGCCTTTGA (SEQ ID NO: 5)

FIG. 4



cyc-b7



Red Setter

FIG. 5



cyc-b7



Red Setter

FIG. 6