

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 016**

51 Int. Cl.:

**A01H 5/08** (2008.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2016 PCT/EP2016/076079**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017 WO17072300**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2016 E 16790560 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2024 EP 3367782**

54 Título: **Planta de tomate que produce frutos con compuestos beneficiosos**

30 Prioridad:

**30.10.2015 WO PCT/EP2015/075212**

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

**18.06.2024**

73 Titular/es:

**RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.  
(100.0%)**

**Burgemeester Crezeelaan 40  
2678 KX De Lier, NL**

72 Inventor/es:

**SOLLEVELD, JOHAN CORNELIS;  
NOWOSIELSKI, AGATHE ANNA y  
KOOPMANS, ROY**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 973 016 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 de tomate que produce frutos con compuestos beneficiosos

5 La presente invención se refiere a plantas de *Solanum lycopersicum* (tomate) que producen frutos que comprenden compuestos beneficiosos. La invención también se refiere a las semillas de dichas plantas y al material de propagación para obtener dichas plantas.

10 Las plantas de la especie *Solanum lycopersicum* (tomate) pertenecen a la familia de las solanáceas, también conocidas como *Solanaceae*. Dentro de esta familia, en la actualidad se agrupa en el género *Solanum*, que no solo comprende el tomate, sino también los cultivos alimentarios importantes de la patata y la berenjena. Es una especie vegetal perenne, herbosa y de floración que es nativa de América del Sur.

15 Otras especies relacionadas con el tomate dentro del género *Solanum* son, por ejemplo *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum chilense*, *Solanum peruvianum* y *Solanum habrochaites*. Aunque se conoce que su cruce puede resultar considerablemente difícil, estas especies se usan para obtener rasgos que son valiosos en el cultivo de plantas de tomate. Recientemente, los avances en la reproducción del tomate han permitido obtener variedades de tomate que tienen, por ejemplo, una mayor productividad, una mayor resistencia a enfermedades y una mayor vida útil.

20 La producción comercial de verduras, incluida la producción de tomate, se ve afectada por muchas condiciones. La elección por parte del cultivador de una cierta variedad es un factor determinante, y constituye la base genética para el resultado que puede lograrse. Además, existen numerosos factores externos que influyen en el resultado. Las condiciones del cultivo, tales como el clima, el suelo y el uso de aditivos, tales como fertilizantes, desempeñan un papel importante. Existen diversas maneras de cultivar tomates y otros cultivos, siendo las más comunes, entre las mismas: la producción en campo abierto, en invernadero y en umbráculo. Aunque las especies pueden ser cultivadas  
25 en un amplio intervalo de condiciones climáticas, se obtiene el mayor éxito en condiciones secas y cálidas. Además de esto, la presencia de plagas y enfermedades también afecta la productividad total que se puede alcanzar.

30 Asimismo, en otras partes de la cadena alimenticia, es necesario cumplir ciertos requisitos con respecto a los frutos de tomate. Esto se refiere al grado en que los frutos de tomate pueden contribuir a una dieta sana y/o un aspecto atractivo. Además de evitar el uso de productos químicos en el proceso de cultivo, también se refiere a la composición del propio fruto de tomate. Por lo tanto, la reproducción de rasgos que tienen tales ventajas para los consumidores ha recibido más atención durante los últimos años.

35 El color más común del fruto de tomate, rojo, se debe al compuesto licopeno, que es el resultado de la biosíntesis de los carotenoides. Los frutos de tomate obtienen su color rojo cuando, durante la etapa de rompiente en el proceso de maduración del tomate, la expresión de genes corriente arriba del licopeno en la biosíntesis de los carotenoides se sobreexpresa, mientras que la producción de enzimas que procesan adicionalmente el licopeno se detiene. Se conocen varios mutantes que producen frutos de tomate que tienen un color distinto del rojo y, por lo tanto,  
40 probablemente comprenden una biosíntesis de licopeno afectada. El alelo *amarillo-carne*, un mutante de pérdida de función del gen *psyl*, ya se describió hace mucho tiempo y da como resultado frutos que tienen un color amarillo pálido. Otro mutante se designó *naranja*, siendo afectado en el gen *CrtISO*, dando como resultado la formación de frutos de tomate bastante anaranjados, debido a la acumulación de prolipopeno, el precursor directo del licopeno. Más recientemente, se identificó el gen que codifica la proteína ZISO, dando como resultado niveles elevados de fitoeno,  
45 fitoflueno y/o  $\zeta$ -caroteno. Esta mutación produce un fruto de tomate que tiene un color naranja o rojo pálido.

50 Si bien se considera que los compuestos bioquímicos derivados de la vía de los carotenoides tienen una contribución positiva a la dieta humana, también se considera que los flavonoides son compuestos saludables. Existe un interés general en estrategias de reproducción para aumentar el nivel de estos metabolitos secundarios, por ejemplo, en el tomate. Actualmente, se han caracterizado más de 5000 flavonoides de origen natural en diversas plantas. Están ampliamente distribuidos, y cumplen muchas funciones, siendo la pigmentación una de las mismas. Según su estructura química, se puede realizar una división en subgrupos. Los subgrupos generalmente reconocidos son: antoxantinas, flavanonas, flavanoles, flavanos y antocianidinas. El último grupo comprende antocianinas, que son pigmentos vacuolares solubles en agua. Dependiendo del pH, pueden tener un aspecto rojo, púrpura o azul, y se  
55 producen en todos los tejidos de plantas superiores.

60 Es conocido que los tomates cultivados producen hasta cierto punto antocianinas, pero los enfoques transgénicos han revelado que tras la activación adecuada de la vía biosintética de antocianina, el nivel de antocianina aumenta en gran medida. Además de los enfoques transgénicos, también los parientes salvajes del tomate acumulan antocianinas en la piel del fruto, y a través de cruces interespecíficos esto se ha transferido al tomate cultivado. Por ejemplo, se descubrió que dos loci *Aft* y *atv*, desempeñan un papel en la acumulación de antocianina. Sin embargo, para ambos loci, no se ha proporcionado ninguna evidencia completa con respecto a la identidad genética, aunque se han proporcionado resultados que respaldan la hipótesis de que ANTI es el gen responsable de la acumulación de antocianina en los frutos del genotipo AFT.  
65

Se descubrió que las antocianinas son potentes antioxidantes *in vitro*. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria permite reivindicar claramente las propiedades saludables de las antocianinas: “*Contiene antioxidantes que se producen naturalmente, que pueden ayudar a proteger contra el daño causado por radicales libres, como parte de un estilo de vida saludable.*” Esto estimula adicionalmente a los investigadores y a los cultivadores de plantas a buscar también el enriquecimiento del fruto de tomate con estos compuestos.

Se puede encontrar un aspecto negativo de la pigmentación de los frutos de tomate con antocianinas, por la percepción del consumidor. El color púrpura de los tomates que comprenden niveles de antocianina más altos, como resulta conocido en la técnica anterior, podría asociarse, por ejemplo, a técnicas de transgénesis u otras técnicas de reproducción no tradicionales. En la percepción de tales consumidores, el color desviado del fruto solo puede crearse con tales técnicas de transgénesis y no mediante métodos de reproducción y programas de reproducción tradicionales.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es dar a conocer plantas de tomate que produzcan frutos que comprendan niveles más altos de antocianinas, en donde dichos frutos no desarrollen un color de fruto púrpura en el momento de la cosecha.

Durante la investigación que condujo a la presente invención, se identificó un QTL que, cuando está presente en el genoma de una planta de tomate, conduce a la producción de frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho QTL en su genoma y cuyos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro. Los niveles más altos de antocianina están presentes en todas las etapas de desarrollo del fruto, lo que significa que también en las etapas inmaduras y de rompimiento se observan niveles de antocianinas más altos. Esto da como resultado un color púrpura-verde de los frutos durante la etapa inmadura y de rompimiento (**Figura 6**), mientras que en la etapa de cosecha en estado rojo maduro, el color del fruto es rojo intenso.

La invención se refiere a una planta de tomate que porta un gen modificado *SIAN2* como se define en la reivindicación 1 en su genoma. Este gen modificado conduce a la producción de frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho gen modificado *SIAN2* en su genoma, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro. Además, dichos frutos tienen un color púrpura-verde durante la etapa inmadura y de rompimiento.

El gen modificado se encontró en un estudio de mapeo de QTL que se realizó para identificar la región genética como causa de este rasgo. En este estudio, se identificó un QTL, designado QTL1, en el cromosoma 10, entre las posiciones que pueden identificarse con secuencias marcadoras **ld. de sec. nº. 1** y el extremo del cromosoma 10. Cuando estos marcadores se disponen en la secuencia de genoma disponible públicamente de *Solanum lycopersicum* en base al cultivar de tomate endogámico 'Heinz 1706' (versión SL2.50, anotación ITAG2.4), el SNP indicado, un polimorfismo [T/C], en **ld. de sec. nº. 1** corresponde a la posición física 63,102,099 y el extremo del cromosoma 10 corresponde a la posición física 65,527,505. Por lo tanto, la posición del QTL1 también se puede derivar de este mapa público y es relativa con respecto a dichas posiciones físicas. Se puede acceder a la secuencia de genoma del tomate en base al cultivar de tomate endogámico 'Heinz 1706' (versión SL2.50, anotación ITAG2.4) en: [www.solgenomics.net](http://www.solgenomics.net), que es la referencia para 'el genoma de tomate público' como se usa en la presente descripción.

Una genotipificación adicional dio como resultado el mapeo de uno o dos marcadores de SNP que pueden usarse para la identificación de QTL1, representándose dichos marcadores de SNP por **ld. de sec. nº. 2** e **ld. de sec. nº. 3**.

El marcador de secuencia **ld. de sec. nº. 2** se dispone en la secuencia de genoma disponible públicamente de *Solanum lycopersicum* basada en el cultivar de tomate endogámico 'Heinz 1706' (versión SL2.50, anotación ITAG2.4) y el SNP indicado, un polimorfismo [T/C], en **ld. de sec. nº. 2** corresponde a la posición física 65,134,950.

El marcador de secuencia **ld. de sec. nº. 3** se dispone en la secuencia de genoma disponible públicamente de *Solanum lycopersicum* basada en el cultivar de tomate endogámico 'Heinz 1706' (versión SL2.50, anotación ITAG2.4) y el SNP indicado, un polimorfismo [G/T], en **ld. de sec. nº. 3** corresponde a la posición física 65,133,628. Las secuencias de **lds. de sec. nº. 1-3**, en relación con QTL1 se pueden encontrar en la **Figura 1**.

En la posición 61 de **ld. de sec. nº. 1** una 'C' está presente como un SNP de la alternativa 'T', de modo que la presencia de 'C' es indicativa de la presencia de QTL1; en la posición 139 de **ld. de sec. nº. 2** una 'C' está presente como un SNP de la alternativa 'T', de modo que la presencia de 'C' es indicativa de la presencia de QTL1; en la posición 141 de **ld. de sec. nº. 3** una 'T' está presente como un SNP de la alternativa 'G', de modo que la presencia de 'T' es indicativa de la presencia de QTL1.

Se descubrió que los marcadores que tienen **ld. de sec. nº. 2** e **ld. de sec. nº. 3** estaban dispuestos dentro del gen *SIAN2* (Solyc10g086250) en el cromosoma 10. El gen modificado *SIAN2* comprende al menos una modificación en comparación con la secuencia de tipo salvaje, cuya modificación conduce a la alteración o ausencia de actividad de la proteína *SIAN2*, en donde el gen modificado *SIAN2* es capaz de conferir el rasgo de la invención a una planta de tomate. Una planta de tomate que comprende un gen modificado *SIAN2*, también se refiere a una planta de tomate de la invención.

El gen modificado *S/AN2* puede usarse para el desarrollo de una planta de tomate de la invención. La modificación que conduce al gen modificado *S/AN2*, da como resultado un triplete alterado dentro de la secuencia codificante, en particular, la modificación comprende un polimorfismo de nucleótido único (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) en la posición 610 de la secuencia codificante (Coding Sequence - CDS). La CDS es la parte de un gen, compuesta por exones, que codifica la proteína. El SNP se define como un cambio del nucleótido G (tipo salvaje) a T. Este SNP es el mismo que el SNP en la posición 1561 de la secuencia genómica. Este SNP da como resultado un cambio de aminoácido en la posición 204 de la secuencia de proteína. La secuencia de aminoácido de tipo salvaje comprende un residuo de ácido aspártico (D) en esta posición y la secuencia de aminoácido mutante comprende un residuo de tirosina (Y) en esta posición. Este SNP, que resulta en un gen modificado *S/AN2*, se puede encontrar en plantas cultivadas a partir de semilla cuya muestra representativa se depositó con el NCIMB con el número de acceso NCIMB 42470.

En el estudio de mapeo de QTL también se identificó un segundo QTL, designado QTL2. Este QTL se ubica en el cromosoma 9, entre las secuencias marcadoras **ld. de sec. n.º. 4** y **ld. de sec. n.º. 5**. Cuando estos marcadores se disponen en la secuencia de genoma disponible públicamente de *Solanum lycopersicum* basada en el cultivar de tomate endogámico 'Heinz 1706' (versión SL2.50, anotación ITAG2.4), el SNP indicado, un polimorfismo [C/T], en **ld. de sec. n.º. 4** corresponde a la posición física 2,593,958 y el SNP indicado, un polimorfismo [G/A], en **ld. de sec. n.º. 5** corresponde a la posición física 68,460,116. Por lo tanto, la posición del QTL2 también se puede derivar de este mapa público y es relativa con respecto a dichas posiciones físicas.

En el estudio de mapeo de QTL también se identificó un tercer QTL, designado QTL3. Este QTL se ubica en el cromosoma 7, entre las secuencias marcadoras **ld. de sec. n.º. 13** y **ld. de sec. n.º. 14**. Cuando estos marcadores se disponen en la secuencia de genoma disponible públicamente de *Solanum lycopersicum* basada en el cultivar de tomate endogámico 'Heinz 1706' (versión SL2.50, anotación ITAG2.4), el SNP indicado, un polimorfismo [C/T], en **ld. de sec. n.º. 13** corresponde a la posición física 59,721,395 y el SNP indicado, un polimorfismo [A/G], en **ld. de sec. n.º. 14** corresponde a la posición física 62,964,169. Por lo tanto, la posición del QTL3 también se puede derivar de este mapa público y es relativa con respecto a dichas posiciones físicas.

Como se usa en la presente descripción, el término 'niveles más altos de antocianinas' significa que el valor indicativo del nivel de antocianinas según lo determinado por el método descrito en el **Ejemplo 2**, es, en orden creciente de preferencia, al menos 0,008, 0,010, 0,012, 0,014, 0,016, 0,018 o 0,020. Valores más altos que 0,020 también se consideran indicativos de niveles más altos de antocianinas. Cuando se comparan los frutos producidos por una planta de tomate que comprende el gen modificado *S/AN2* de la invención en su genoma con frutos producidos por una planta de tomate que no comprende el gen modificado de la invención en su genoma, el término 'niveles más altos de antocianinas' también significa que el valor indicativo del nivel de antocianinas según lo determinado por el método descrito en el **Ejemplo 2** es, en orden creciente de preferencia, un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 % más alto en frutos producidos por una planta de tomate que comprende el gen modificado *S/AN2* de la invención. Los niveles más altos de antocianinas se determinan adecuadamente tras el análisis de los frutos producidos por una planta de tomate que porta el gen modificado *S/AN2* de la invención en comparación con una planta de tomate que no porta el gen modificado *S/AN2* de la invención según se define en la presente memoria.

Como se usa en la presente descripción, el término 'etapa de cosecha en estado rojo maduro' significa que el fruto de tomate ha alcanzado un color de fruto que refleja una etapa de madurez que, según la percepción del consumidor promedio, sería el momento apropiado para consumir dicho fruto de tomate. Esto se menciona explícitamente porque, a menudo, los frutos de tomate se cosechan en la etapa verde madura o de rompimiento, tras lo cual se vuelven de color rojo maduro durante su almacenamiento. La ventaja de tal práctica es que los frutos todavía son muy firmes en la cosecha y, por lo tanto, tienen una alta resistencia a magulladuras. Los frutos llegarán al consumidor con un color rojo maduro y sin daños. El experto en la técnica conoce cuándo un fruto de tomate ha alcanzado la 'etapa de cosecha en estado rojo maduro'. Con tal fin, el experto puede recurrir al denominado protocolo técnico para pruebas sobre distinción, uniformidad y estabilidad, publicado por la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales. En el protocolo del tomate, el color del fruto se determina en la madurez: 'El color en la madurez tiene que observarse después de un cambio completo de color, cuando la placenta se encuentra claramente en la sección transversal'.

Como se usa en la presente descripción, el término 'púrpura', como se usa en la frase 'en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro' se refiere al color de un fruto de tomate como se observa, por ejemplo, en las variedades de tomate Indigo Rose, Purple Haze, Black Galaxy o Black Beauty. Esta es una lista no exhaustiva. Los frutos que son producidos por la planta de tomate de la invención tienen un color rojo intenso en la etapa de cosecha en estado rojo maduro.

El término 'en donde los frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro' se puede usar indistintamente con el término 'en donde el color de los frutos cambia de púrpura claro o púrpura en la etapa no madura a rojo o rojo intenso en la madurez de los frutos'. Por 'madurez de los frutos' se entiende la etapa de cosecha en estado rojo maduro. Como la 'etapa no madura' se indican todas las etapas de desarrollo de los frutos, antes de que el fruto alcance la madurez o la etapa de cosecha en estado rojo maduro, según se define en la presente memoria.

La introgresión de un gen modificado *S/AN2* como se usa en la presente descripción significa la introducción de un gen modificado *S/AN2* de una planta donante que comprende dicho gen modificado *S/AN2* en una planta receptora que no porta dicho gen modificado *S/AN2* mediante técnicas de reproducción estándar, en donde la selección se puede realizar de forma fenotípica mediante observación y análisis de los frutos de tomate para determinar si comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho gen modificado *S/AN2* en su genoma, y si dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro. La selección también se puede realizar con el uso de marcadores mediante reproducción asistida por marcadores, o combinaciones de los mismos. La selección se inicia en la generación F1 o cualquier generación adicional de un cruce entre la planta receptora y la planta donante, convenientemente, usando marcadores como se identifica en la presente descripción. Sin embargo, el experto está familiarizado con la creación y el uso de nuevos marcadores moleculares que pueden identificar o ligarse a un rasgo específico.

Una planta de tomate de la invención puede comprender el gen modificado *S/AN2* en combinación con QTL2 y/o QTL3.

En el número de depósito NCIMB 42470 QTL1 y QTL2 y QTL3 están presentes en forma homocigótica.

La invención según un aspecto adicional de la misma se refiere a una semilla, en donde la planta que puede crecer a partir de la semilla es una planta de la invención, que comprende el gen modificado *S/AN2* que conduce a la producción de frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho gen modificado *S/AN2* en su genoma, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro. La invención también se refiere a semillas de una planta según se reivindica. Las semillas albergan el gen *S/AN2* modificado que, cuando se cultiva una planta a partir de las semillas, convierte a esta planta en una planta de la invención.

También se describe en la presente descripción la descendencia de la planta de la invención, cuya descendencia comprende el gen modificado *S/AN2*. Tal descendencia puede ser en sí misma una planta, una célula, un tejido o una semilla.

La descendencia también comprende una planta que porta el gen modificado *S/AN2* y tiene el rasgo de la invención, y se obtiene de otra planta o la descendencia de una planta de la invención mediante propagación o multiplicación vegetativa. La descendencia comprende adecuadamente el gen modificado *S/AN2*.

La invención se refiere además a una parte de una planta reivindicada que es adecuada para la reproducción sexual. Una parte de este tipo se selecciona, por ejemplo, del grupo que consiste en una microspora, un polen, un ovario, un óvulo, un saco embrionario y un ovocito. Además, la invención se refiere a una parte de una planta reivindicada que es adecuada para la reproducción vegetativa, que se selecciona, por ejemplo, del grupo que consiste en un esqueje, una raíz, un tallo, una célula y un protoplasto. La parte de la planta tal como se menciona anteriormente se considera material de propagación. La planta que se produce a partir del material de propagación comprende el gen modificado *S/AN2*.

Según un aspecto adicional de la misma, la invención da a conocer un cultivo de tejidos de una planta que porta el gen modificado *S/AN2* de la invención, que también es material de propagación. El cultivo de tejidos comprende células regenerables. Tal cultivo de tejidos puede seleccionarse o derivarse de cualquier parte de la planta, por ejemplo, puede seleccionarse del grupo que consiste en una hoja, un polen, un embrión, un cotiledón, un hipocótilo, una célula meristemática, una raíz, ápices radiculares, una antera, una flor, una semilla y un tallo. El cultivo de tejidos se puede regenerar en una planta que porta el gen modificado *S/AN2* de la invención, cuya planta regenerada expresa el rasgo de la invención y también forma parte de la invención.

Además, en la presente descripción se describe una semilla híbrida y un método para producir una semilla híbrida de este tipo que comprende cruzar una primera planta progenitora con una segunda planta progenitora y cosechar la semilla híbrida resultante, en donde dicha primera planta progenitora y/o dicha segunda planta progenitora tienen el gen modificado *S/AN2* de la invención. La planta híbrida resultante que comprende el gen modificado *S/AN2* de la invención y que produce frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho gen modificado *S/AN2* en su genoma, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro, también es una planta de la invención.

La planta de la invención que comprende el gen modificado *S/AN2* de la invención de forma homocigótica o heterocigótica puede ser una planta de una línea endogámica, un híbrido, un haploide duplicado o una planta de una población de separación.

También se describe en la presente descripción un método para la producción de una planta de tomate que tiene el gen modificado *S/AN2* que conduce a la producción de frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho gen modificado *S/AN2* en su genoma, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro, mediante el uso de

una semilla que comprende el gen modificado *SIAN2* para cultivar dicha planta de tomate. Las semillas son, adecuadamente, semillas cuya muestra representativa se depositó con el NCIMB con el número de depósito 42470.

Una planta de tomate de la invención que porta el gen modificado *SIAN2* de la invención y puede haber adquirido dicho gen modificado *SIAN2* de una fuente adecuada, ya sea por reproducción convencional o modificación genética, en particular, mediante cisgénesis o transgénesis. La cisgénesis es la modificación genética de plantas con un gen natural, que codifica un rasgo (agrícola), de la propia planta de cultivo o de una planta donante compatible sexualmente. La transgénesis es la modificación genética de una planta con un gen de una especie no cruzada o un gen sintético.

En una realización, la fuente a partir de la cual se adquiere el gen modificado *SIAN2* de la invención está formada por plantas cultivadas a partir de una semilla cuya muestra representativa se depositó con el número de acceso NCIMB 42470, o a partir de las semillas depositadas NCIMB 42470, o a partir de sus descendientes sexuales o vegetativos, o a partir de otra fuente que comprende el gen definido en la presente descripción que conduce al rasgo de la invención, o a partir de una combinación de estas fuentes.

La invención se refiere a una planta de *Solanum lycopersicum* no transgénica. La fuente para adquirir el gen modificado *SIAN2* de la invención, para obtener una planta de la invención, es adecuadamente una planta de *Solanum lycopersicum* que porta el gen comprendido de manera homocigótica en NCIMB 42470 o, alternativamente, una planta de una especie *Solanum* que porta el gen modificado *SIAN2* y que se puede cruzar con *Solanum lycopersicum*. Cuando se usa una especie *Solanum* distinta de *Solanum lycopersicum* como la fuente de un gen modificado *SIAN2* de la invención, opcionalmente, se pueden realizar técnicas tales como rescate de embriones, retrocruzamiento u otras técnicas conocidas por el experto en la técnica para obtener semillas del cruce interespecífico, cuyas semillas pueden usarse como la fuente para el desarrollo adicional de una planta de *Solanum lycopersicum* no transgénica que produce frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho gen modificado *SIAN2* en su genoma, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro.

Para obtener un gen modificado *SIAN2* de una fuente en donde está presente de forma heterocigótica, es posible cultivar las semillas de dicha planta y las flores pueden polinizarse con polen de la misma planta o de una planta que también tiene el gen modificado *SIAN2* de forma heterocigótica para obtener frutos con semillas. Cuando estas semillas se siembran, las plantas resultantes se separarán según las relaciones normales de separación, lo que significa que aproximadamente el 25 % de las plantas tendrán el gen modificado *SIAN2* de forma homocigótica, aproximadamente el 50 % tendrán el gen modificado *SIAN2* de forma heterocigótica, y aproximadamente el 25 % no tendrán el gen modificado *SIAN2*. La presencia del gen modificado *SIAN2* para la selección de una planta preferida, que tiene el gen modificado *SIAN2* de forma homocigótica o de forma heterocigótica, puede determinarse adecuadamente usando los marcadores como se describe en la presente descripción. Alternativamente, las plantas pueden observarse de forma fenotípica y los frutos pueden analizarse para determinar la presencia del rasgo de la invención.

También se describe en la presente descripción el germoplasma de una planta de la invención. El germoplasma está constituido por todas las características heredadas de un organismo y, según la invención, abarca al menos el rasgo de la invención. El germoplasma se puede usar en un programa de reproducción para el desarrollo de plantas de tomate que producen frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas, manteniendo al mismo tiempo un color de fruto no púrpura. El uso del germoplasma que comprende el gen modificado *SIAN2* que conduce a una planta de tomate que produce frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho gen modificado *SIAN2* en su genoma, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro, también forma parte de la presente invención.

El gen modificado *SIAN2* puede usarse para el desarrollo de una planta de tomate que produce frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho gen modificado *SIAN2* en su genoma, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro.

En una realización, la invención se refiere a un fruto de tomate que comprende el gen modificado *SIAN2* en su genoma que conduce a niveles más altos de antocianinas en comparación con un fruto que no porta dicho gen modificado *SIAN2* en su genoma, cuyo fruto no es púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro.

Una planta de tomate de la invención puede producirse mediante:

- a) cruzar una planta que comprende el gen modificado *SIAN2*, habiéndose depositado la semilla representativa de dicha planta como NCIMB 42470, con una planta que no comprende dicho gen, para obtener una población F1;
- b) realizar opcionalmente una o más rondas de autopolinización y/o cruzar una planta de la F1 para obtener una población de generación posterior;

5 c) seleccionar una planta que comprende el gen modificado *S/AN2* y que produce frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho gen en su genoma, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro, adecuadamente, usando marcadores moleculares ligados al gen modificado *S/AN2*. La planta también puede seleccionarse de forma fenotípica y sus frutos también se pueden analizar con respecto a niveles más altos de antocianinas y que dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro.

10 Un método para introducir otro rasgo deseado en una planta de tomate que porta el gen modificado *S/AN2* en su genoma que conduce a la producción de frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho QTL en su genoma, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro, puede comprender:

15 a) cruzar una planta de tomate que comprende el gen modificado *S/AN2*, cuya semilla representativa se depositó con el NCIMB como NCIMB 42470, con una segunda planta de tomate que comprende el otro rasgo deseado para producir descendencia F1;

b) seleccionar una descendencia F1 que comprende el gen modificado *S/AN2* y comprende el otro rasgo deseado;

20 c) cruzar la descendencia F1 seleccionada con cualquier progenitor, para producir descendencia de retrocruce;

d) seleccionar la descendencia de retrocruce que comprende el gen modificado *S/AN2* y el otro rasgo deseado; y

25 e) opcionalmente, repetir las etapas c) y d) una o más veces en sucesión para producir una cuarta descendencia de retrocruce o descendencia de retrocruce adicional seleccionada que comprende el rasgo deseado y el gen modificado *S/AN2*. La invención incluye una planta de tomate producida mediante este método y el fruto de tomate.

30 Opcionalmente, las etapas de autopolinización se realizan después de cualquiera de las etapas de cruce o retrocruce. La selección para una planta que comprende el gen modificado *S/AN2* de la invención y el otro rasgo deseado puede realizarse alternativamente después de cualquier etapa de cruce o autopolinización del método.

35 Un método para la producción de una planta de tomate según se define en la presente memoria puede comprender el uso de una técnica de generación de doble haploide para generar una línea de doble haploide que comprende de forma homocigótica el gen modificado *S/AN2*.

40 Un método para la producción de una planta de tomate que porta el gen modificado *S/AN2* en su genoma que conduce a la producción de frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho gen en su genoma, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro, puede comprender usar una semilla que comprende el gen modificado *S/AN2* en su genoma y cultivar una planta a partir de la misma. La semilla es, adecuadamente, una semilla cuya muestra representativa se depositó con el NCIMB con el número de depósito NCIMB 42470.

45 Un método para la producción de semillas que comprende cultivar una planta de tomate a partir de una semilla que comprende el gen modificado *S/AN2* en su genoma puede comprender permitir que la planta produzca semillas al permitir que ocurra la polinización, y cosechar esas semillas. La producción de las semillas se realiza adecuadamente mediante cruce o autopolinización. Preferiblemente, las semillas así producidas tienen la capacidad de crecer hasta formar una planta de tomate de la invención.

50 Un método para la producción de una planta de tomate que comprende el gen modificado *S/AN2* que conduce a una planta de tomate de la invención, puede comprender usar cultivo de tejidos de material vegetal que porta el gen modificado *S/AN2* en su genoma.

55 Un método para la producción de una planta de tomate que comprende el gen modificado *S/AN2* que conduce a una planta de tomate de la invención, puede comprender usar reproducción vegetativa de material vegetal que porta el gen modificado *S/AN2* en su genoma.

60 El término 'rasgo de la invención', como se usa en la presente descripción, pretende referirse al fenotipo de un fruto que comprende niveles más altos de antocianinas, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro, debido a la presencia del gen modificado *S/AN2*. El rasgo de la invención también se refiere a otro aspecto del fenotipo, p. ej., el color púrpura-verde de los frutos durante la etapa inmadura y de rompimiento, también debido a la presencia del gen modificado *S/AN2*.

65 El término 'planta de la invención', como se usa en la presente descripción, pretende referirse a una planta de tomate que porta el gen modificado *S/AN2* en su genoma que conduce a la producción de frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dicho gen

modificado *S/AN2* en su genoma, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro. Una planta de este tipo de la invención produce frutos que muestran un color púrpura-verde durante la etapa inmadura y de rompimiento. El fruto producido por una planta de este tipo de la invención también se denomina fruto de la invención. Los frutos de la invención se representan en **Figura 7**.

El término 'planta de tomate que no porta el gen modificado *S/AN2* de la invención' como se usa en la presente descripción es preferiblemente una planta isogénica que tiene el mismo genotipo que una planta de la invención, excepto por la presencia del gen modificado *S/AN2* de la invención. Dicha planta isogénica se usa adecuadamente cuando se comparan los niveles de antocianinas, con el fin de observar niveles más altos de antocianinas en una planta de la invención. En este contexto, la variedad de tomate 'Moneyberg' puede considerarse como una planta de este tipo.

El término 'descendencia' como se usa en la presente descripción pretende significar el primer y todos los descendientes adicionales de un cruce con una planta de la invención que comprende el gen modificado *S/AN2*.

#### Información de depósito

Semillas representativas de plantas de *Solanum lycopersicum* que comprenden QTL1 y QTL2 y QTL3 se depositaron con el número de acceso NCIMB 42470 el 23 de octubre de 2015 con NCIMB Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA). Todas las semillas del depósito comprenden QTL1 y QTL2 y QTL3 de manera homocigótica. Las plantas cultivadas a partir de estas semillas producen, por lo tanto, frutos que comprenden niveles más altos de antocianinas en comparación con los frutos producidos por una planta de tomate que no porta dichos QTL en su genoma, en donde dichos frutos no son púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro.

Las semillas depositadas no cumplen los criterios DUS que son necesarios para obtener la protección de variedad de planta y, por lo tanto, no pueden considerarse una variedad de planta.

La presente invención se detallará en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen solamente fines ilustrativos, y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera de la presente invención.

#### Figuras

La invención se ilustrará con más detalle en los ejemplos descritos a continuación. En estos ejemplos se hace referencia a las siguientes figuras.

La **Figura 1** muestra secuencias marcadoras de SNP de las Ids. de sec. nº. 1-3 en relación con el QTL1 en el cromosoma 10. La versión dada es la versión que está relacionada con el QTL1, es decir, la secuencia que comprende el nucleótido de tipo no salvaje en la posición de SNP. También se proporciona la posición del polimorfismo o el SNP dentro de la Id. de sec. nº. respectiva, y el nucleótido en esa posición se enfatiza tanto en negrita como en subrayado.

La **Figura 2** muestra secuencias marcadoras de SNP de las Ids. de sec. nº. 4-12 y 21-23 en relación con el QTL2 en el cromosoma 9. La versión dada es la versión que está relacionada con el QTL2, es decir, la secuencia que comprende el nucleótido de tipo no salvaje en la posición de SNP. También se proporciona la posición del polimorfismo o el SNP dentro de la Id. de sec. nº. respectiva, y el nucleótido en esa posición se enfatiza tanto en negrita como en subrayado.

La **Figura 3** muestra secuencias marcadoras de SNP de las Ids. de sec. nº. 13-20 en relación con el QTL3 en el cromosoma 7. La versión dada es la versión que está relacionada con el QTL3, es decir, la secuencia que comprende el nucleótido de tipo no salvaje en la posición de SNP. También se proporciona la posición del polimorfismo o el SNP dentro de la Id. de sec. nº. respectiva, y el nucleótido en esa posición se enfatiza tanto en negrita como en subrayado.

La **Figura 4** muestra un gráfico que representa el contenido de antocianina medido en los cuatro fenotipos diferentes (380 (color púrpura oscuro en la etapa inmadura), 350 (color púrpura medio en la etapa inmadura), 379 (color púrpura claro en etapa inmadura) y 486 (color verde en la etapa inmadura)) durante tres etapas de desarrollo del fruto (siendo 'verde' inmaduro, 'medio' la etapa de rompimiento, y 'rojo' rojo maduro).

La **Figura 5** muestra una tabla que muestra las diferencias significativas para los cuatro fenotipos. La columna 'Referencia' se refiere a estos diferentes fenotipos. La columna 'Media' proporciona los valores promedio indicativos del nivel de antocianinas según lo determinado por el método que se describe en **Ejemplo 2**. Las diferentes letras en la columna 'Grupo' indican que los valores promedio de los fenotipos respectivos son significativamente diferentes entre sí, según el análisis estadístico realizado. La columna 'Descripción visual' describe el color de los frutos de tomate en la etapa inmadura. La

**Figura 6** muestra la tabla de referencia usada para fenotipificar el contenido de antocianina en los frutos. Los números en el lado derecho son la escala usada para el fenotipificado. El contenido de antocianina se puntuó visualmente en seis clases, que van de 0 a 5 (0 = ausente, 1 = muy bajo, visible como una multitud de puntos de color púrpura, 2 =

bajo, el color púrpura cubre más la superficie de la totalidad del fruto, sin embargo, aún son visibles puntos púrpura, 3 = medio, el color púrpura se refleja en un color plano, en esta cantidad proporciona un aspecto púrpura-gris al fruto, 4 = alto, casi la totalidad del fruto tiene un color púrpura, pero con una intensidad de color púrpura más baja, 5 = muy alto, casi la totalidad del fruto es púrpura, con una intensidad de color púrpura alta). Cabe destacar que la clase 4 no está presente en la **Figura 6**.

La **Figura 7** muestra dos grupos de frutos de tomate; el grupo ubicado en el lado izquierdo del panel comprende frutos producidos por plantas que portan al menos un QTL, mientras que el grupo ubicado en el lado derecho del panel comprende frutos producidos por plantas que no portan dicho QTL.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Mapeo de QTL y desarrollo de marcadores

Para identificar las regiones genómicas (QTL) responsables del rasgo de la invención, se desarrolló una población F2 de 180 líneas F2 a partir de un cruce de la línea TS 278 y la línea TS 360. TS360 es el progenitor donante para el rasgo de la invención, mientras que TS278 es una línea de cereza sin contenido de antocianina.

Esta población fue fenotipificada con respecto al color púrpura (como una indicación del contenido de antocianina) en la planta y el fruto en dos momentos durante el año. El contenido de antocianina se puntuó visualmente con respecto a la intensidad del color púrpura en cinco categorías en dos momentos tanto para los frutos como para las plantas. El rasgo fue fenotipificado a ojo, usando una tabla de referencia autofabricada (**Figura 6**). El fenotipificado se realizó en dos momentos diferentes; en el primer momento, las plantas disfrutaban de condiciones relativas de mucha luz, mientras que, durante el segundo momento, la cantidad de luz disponible ya ha disminuido. Por lo tanto, se observó una disminución en el contenido de antocianina en los frutos en la segunda puntuación. Los frutos se fenotipificaron con respecto a una etapa verde madura o de rompimiento, tal como puede observarse claramente en la **Figura 6**.

Todas las plantas F2 y sus progenitores se puntuaron con tres genotipos: AA para el progenitor homocigótico 1, BB para el progenitor homocigótico 2 y H para plantas heterocigóticas. Antes de la construcción del mapa de ligamiento en el software JoinMap, se filtraron y descartaron marcadores no polimórficos y marcadores no informativos (distorsión de separación extrema y puntuaciones ausentes completas).

Posteriormente, se realizó una construcción de mapa genético en el software JoinMap 4.0. Se usó en primer lugar una aproximación por mapeo de máxima verosimilitud para estimar el orden de los marcadores en un grupo de ligamiento. Luego se realizó mapeo de regresión para predecir la posición de los marcadores en los grupos de ligamiento usando los órdenes de inicio de los marcadores obtenidos del mapeo de máxima verosimilitud. Se usó una función de mapeo de Haldane para convertir la frecuencia de recombinación entre marcadores en la distancia genética entre marcadores (en centiMorgan, cM). La numeración y la orientación de los grupos de ligamiento se corrigieron mediante el uso de las posiciones del mapa de referencia.

El fenotipificado realizado en el primer momento condujo a la detección de un QTL principal para el contenido de antocianina en frutos en el cromosoma 10. También se detectaron dos QTL menores en el cromosoma 9 y el cromosoma 7. Las variaciones explicadas para estos QTL fueron del 79 %, 10 % y 11 %, respectivamente. En el fenotipificado realizado en el segundo momento, solo el QTL en el cromosoma 10 mostró un efecto con una varianza explicada del 64 %.

Tras la corrección estadística del efecto del QTL principal en el cromosoma 10 para el fenotipificado realizado en el primer momento, los QTL menores todavía se detectaron en el cromosoma 9 y 7, con una varianza explicada aumentada del 17 % para ambos QTL. Este fue también el caso del fenotipificado realizado en el segundo momento, en donde estos QTL menores detectados nuevamente en el cromosoma 9 y 7 presentaron una varianza explicada del 8 % y el 6 %, respectivamente.

### Ejemplo 2

#### Análisis del contenido total de antocianina en los frutos de la invención

Se identificaron varios genotipos basados en su color de fruto púrpura-verde durante las etapas inmaduras y de rompimiento antes de la etapa en estado rojo maduro. Se analizaron las antocianinas de cuatro fenotipos aparentemente diferentes (sin color púrpura [que es el tomate de control rojo], púrpura claro, púrpura medio y púrpura oscuro) recogidos en tres etapas de maduración (no maduro, etapa de rompimiento, rojo maduro). Los diferentes fenotipos se caracterizaron por el color de los frutos antes de la etapa final de cosecha en estado rojo maduro. Los frutos se pesaron mientras que se retiraron los tejidos interiores y el pericarpio restante se pesó y analizó, ya sea recién mezclado con el tampón de extracción o después de su congelación en nitrógeno líquido.

Los tomates se pesaron, se pelaron, y la piel de cada tomate se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. También se pesó la parte restante, y posteriormente se calculó el peso de la piel. La piel de cada muestra se almacenó a -80 °C. Las pieles se molieron según el protocolo con el Grindomix, justo antes del análisis del contenido total de antocianina.

5 El análisis del contenido total de antocianina se realizó de la siguiente manera. La cantidad de muestra total se extrajo una vez, agitando con 30 ml. 1M de HCl, en metanol 50 %. Después, el extracto se midió con el espectrofotómetro, después de una centrifugación durante 5 minutos a 13.000 rpm. El resultado se corrigió con respecto al contenido de agua en la muestra. Por lo tanto, se midió el porcentaje de Dry Weight (Peso seco - DW) en el gránulo restante. El peso seco en la piel varió del 7,7 al 14,3 %.

10 El contenido total de antocianina se representa en la **Figura 4**. A partir del gráfico, puede derivarse que el contenido total de antocianina difiere entre los cuatro fenotipos. Obsérvese que, en los frutos de tomate de la invención, la cantidad total de antocianinas disminuye ligeramente durante todo el desarrollo del fruto de tomate. Sorprendentemente, los frutos que comprenden las cantidades más altas de antocianinas no tienen un color púrpura en la etapa de cosecha en estado rojo maduro. La diferencia en el contenido total de antocianina entre los cuatro fenotipos también se ejemplifica en la tabla mostrada en la **Figura 5**. A partir de esta tabla, puede derivarse que las diferencias observadas son significativamente diferentes entre sí, como se puede concluir del ANOVA realizado junto con una corrección post hoc de Bonferroni.

15 Ejemplo 3

Transferencia del rasgo de la invención a otras plantas de tomate

25 Una planta cultivada a partir de semillas de las cuales se depositó una muestra representativa con el NCIMB con el número de depósito NCIMB 42470 que contiene QTL1 y QTL2 y QTL3 de forma homocigótica, se cruzó con una planta de tomate que no portaba ninguno de estos QTL. El F1 obtenido del cruce tenía los tres QTL en la etapa heterocigótica. La población F1 no se fenotipificó visualmente con respecto al color púrpura-verde de los frutos durante la etapa inmadura y de rompimiento, ya que no se esperaron niveles más altos de antocianinas.

30 El F1 se autopolinizó y se sembró una gran población de 250 semillas F2. En teoría, se espera que 1 de 64 plantas tenga los tres QTL de forma homocigótica. En la etapa de plántula se llevó a cabo un análisis de marcadores, usando todos los marcadores de SNP que son capaces de identificar los QTL respectivos. Especialmente, se usaron los marcadores preferidos para la identificación, es decir, **ld. de sec. n°. 3** para QTL1; **ld. de sec. n°. 9 y/o ld. de sec. n°. 22** para QTL2; **ld. de sec. n°. 15** para QTL3, respectivamente.

35 Afortunadamente, de las plántulas F2 se pudo identificar un número de plantas a través del análisis de marcadores que contenían QTL1 y QTL2 y QTL3 de manera homocigótica, cuyas plantas se seleccionaron y mantuvieron para una reproducción adicional.

40 Para confirmar que las plantas seleccionadas muestran el rasgo de la invención, se cultivaron plantas, se produjeron frutos y se fenotipificaron visualmente siguiendo el Ejemplo 1 y la tabla de referencia y las clases según la **Figura 6**. También se realizó un análisis del contenido total de antocianina en los frutos de las plantas seleccionadas, según el Ejemplo 2. Se demostró que los frutos producidos por las plantas seleccionadas comprenden niveles más altos de antocianinas, en comparación con los frutos producidos por la planta de tomate precursora que no portaba ninguno de estos QTL de la invención, como se usa en este Ejemplo.

45

**REIVINDICACIONES**

1. Planta de tomate no transgénica que porta un gen modificado SIAN2 en su genoma, en donde el gen modificado SIAN2 se ubica en el cromosoma 10, y el gen modificado SIAN2 está como comprendido en el genoma de una planta de tomate cuya semilla representativa se depositó con el NCIMB con el número de depósito NCIMB 42470, en donde el gen modificado SIAN2 comprende un Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo nucleótido único - SNP) de una G a una T en la posición 610 de la Coding Sequence (Secuencia codificante- CDS) de Solyc10g086250 en el genoma de tomate público, versión SL2.50, anotación ITAG2.4, accesible en [www.solgenomics.net](http://www.solgenomics.net), dando como resultado un cambio de aminoácido en la posición 204 de ácido aspártico (D) a tirosina (Y).
2. Material de propagación adecuado para producir una planta no transgénica según la reivindicación 1, en donde el material de propagación es adecuado para la reproducción sexual, y se selecciona en particular del grupo que consiste en una microspora, un polen, un ovario, un óvulo, un saco embrionario y un ovocito, o es adecuado para la reproducción vegetativa, y se selecciona en particular del grupo que consiste en un esqueje, una raíz, un tallo, una célula, un protoplasto, o es adecuado para cultivos de tejidos de células regenerables, y se selecciona en particular del grupo que consiste en una hoja, un polen, un embrión, un cotiledón, un hipocótilo, una célula meristemática, una raíz, un ápice radicular, una antera, una flor, una semilla y un tallo, en donde la planta producida a partir del material de propagación comprende el gen modificado SIAN2 según como se define en la reivindicación 1.
3. Una semilla de tomate no transgénica que comprende el gen modificado SIAN2 como se define en la reivindicación 1.
4. Fruto de tomate no transgénico que comprende un gen modificado SIAN2 como se define en la reivindicación 1.

## Figura 1

**Id. de sec. nº. 1: SL04285**

CGAAGAAGTCCGATCTTCGCCGGATAAACCTTACGATTTACAGCTTTTATATTCCACGGCCTC  
TTAGGTTCCGGTCGAAATTGGCGATCCTTCTCTCGTTCTCTAGGTTCCCTCCCTTTCT

**Id. de sec. nº. 2: SL086250\_1**

AGTGGTTACAAGTCTTCCACGTATGTTCGAAGGGTTAACTTTTTGTATATATAGAGACAGGAA  
TGGTGTAGTATTATAATTAATAATATATGTATTAAACTATATATTATAGAAAAATAATGAATA  
CTCCTATGTGCGCATCGTTGGGAGTTAGGAAAGGTTTCATGGACTGAACAAGAAGATTCTCTTT  
AAGAGATTGCATTCAAAAATATGGTGAAGGAAAGTGGCATCTTGTTCCTGCTAGAGCTGGTATT  
ACTTTTGTACTTTTTCTAATTTGTTTTAAAAATAATGTATTTTATATATTTAT

**Id. de sec. nº. 3: SL086250\_3**

CAAACGTAAAGAAGAATGATTCTCATTGGTGCAACAACAAAAGTATGATCACAAACACATTAG  
ACAAAAGATGACAAACGTTGCAACGAAATCGTTGTAAATATTTGTGAGAAGCCAATAGGAGAAA  
ATACATCGTCGATAACGATGGAGTTGAATGGTGGACAAATTTACTGGAAAATTGCATTGAAAT  
TGAAGAAGAAACAGCTAATACAAATTTTGGAAAAACACCAACAATGTTGTTACATGAGGAAAT  
ATCACCACCGTTAGTTAATGGTGAAGACAACCTCCATG

## Figura 2

**Id. de sec. nº. 4: SL04227**

TGGCCTAAGCATTTCCTCCGCGAATCCAGATTAGTCAGAGCACCAATATTTGGTTCTGGACATCGA  
ATTGAGAGACC AAAAGAAAACACATAGAGATCTCCFFTGTATTTTA

**Id. de sec. nº. 5: SL04252**

CCAGCGTCCATTCCAAATCTTTCAGCAATGGGAACAACACGATCTGGCCGACTGTAGTACACTT  
GGTTGAGGAAAAAAGATAAAATGGAAAGGAAGCAGCATTCACTTGAGTTCTGCGAG

**Id. de sec. nº. 6: SL00400**

CATCAGCCTCGCTCTCTTCTCGGAATAGCATCAAGGATAGTTCATCAAAGTTCAGGTTCTTCATT  
CAATGGCCAANGATTGTGCCTATCCNGTTCGCGTTTTGCTACCGATATCCAAAACAAGAAAATG  
TCCAGACTATGTATANTGATGGTTCGACCAAAAAATTCAGTTCATACAAGGAACTGATGAGCAA  
ACAATACCAGATGTGAAACTAACAAAGTCAAGGGATGGAACAAATGGTATGGCTATATT

**Id. de sec. nº. 7: SL04429**

GTTACACGAAGCACTCTTACATCGGCTTCTGCTGGGGTAGACAAATATGCTTCGACTAACTGTC  
CACATTCTGCTTCTTCATTTGATTATGTTGTCAGTACATTTGATGAGGGACATCATC

**Id. de sec. nº. 8: SL04231**

TAAGAGTATTACTACGACTACAAGTTGTGTACCCTTGGACCTTTTACGGGGTACTCTTTAATT  
TAAAGAGATCAAAGTTTTTGAAACCAGCACAGATTTTGTGGAT

**Id. de sec. nº. 9: SL04246**

AACTGCTAACATTAGACTAGAAAGAGAACCTTCCATGACTGCCACAGCTTTCCTCTCAGAAATA  
CCCTCTGCTTCTCATCGTCTAGATGCAGTTTCACGACGCCACCTCTAGGTGAGGCCT

**Id. de sec. nº. 10: SL00401**

CAATTACCCCATAGTCCAACAAATGATTTTGGACTGTCTCCGCCACTGGGTAATTGAGTTTCAT  
ATTGATGGTTTTGTTTTGTTAACGCTTCTTCCTTGTTGAGAGGGTTCAATGGAGAGATTCTATC  
TCGTCCCTCCATTAGTTGAAGCTATTGCCTTTGATCCTATCCTTTCAAAGGNCAAGATGATTGCAG  
ATAATTGGAATCCATTAACCAATGATTCTACGGAAAATTTATTCCTCACTGGAGGA

**Id. de sec. nº. 11: SL04247**

GAGCAAGCGGCGGGAAAGTTGTACGAGGCTGCATGTTTGTGAAAGTCCATAATTAAGGCAGGGG  
CTTACTTGTGATCGATGGACGTGTTGATATTCCTGCCGCGGTTAATGCCAGCGGTGT

**Id. de sec. nº. 12: SL01949**

CACAGGGTGCTATIGGGTACGATCTCGATAAGGACACCCGAAAATTCAGTGTACATCTTAAATGG  
GICTTGCAAGTTTCGCATTAGAAGGGTCTTATCAGCTTAGGTATCAATCGAGATTGG

**Id. de sec. nº. 21: SL05501**

AAAATAAAACAAGCTGCTAATCTCTCAAGCTGGAGTCCSCTTGGAGGGCAAAGRCACTGGCCA  
ACAGATAAGGAYTTCCTGCTTCGGGTTCGGTTCAGTTCCTTCCTGCSAAGGACATTCCTTCCTTGCA  
AGCTGTRGAGTGTATCGTTCTTATGAAGTTCAGAGTGAT

**Id. de sec. nº. 22: SL06295**

ATAGTCGGAGCACCCGGCAAAGATGACGGGTTCTCCACCGATGGAAGAGGAAGTTTTGCAAGTG  
GAAGTCTCGATCATCGAAAACGATGCACTGGTGGAGCT

**Id. de sec. nº. 23: SL05502**

TTATATAACAAGGTGAACRCGCGTATTCTGCAGGTATCTTGAACTCTAYTAAYGCTCAGACATCA  
CTTCATCAGTTTGTGGCAACATTGGAACGTAAGAAAGMCAAATGATGATGCCYTGTAAACAAA  
TCSATAAACCCCTCCGTGTCATGCTTGCMTTGTCTAAATTCAGCTA

## Figura 3

**Id. de sec. nº. 13: SL04175**

TAATTTTCTAAATTTAATGATCCCAAGCATCATCAGAGTATCAATAGGTGGACTTTAGAGTTCT  
GTTTCACACTTCAGGATAAAATTCAGATGTGATAAAAATTGACACATGTATTTCGTGATT

**Id. de sec. nº. 14: SL04179**

CCTATCAGTACTTCTTACTTAACAACCTCTTCTCCTTTTATGGTGCTTCCATTTAATACGCGTCTTC  
TCTCATTTCCTTTGATGTTAACGAAAACATGCTATAGCTATGGTT

**Id. de sec. nº. 15: SL04178**

AATGCCAGTTTGATGATCTATGTAGTGATGAAACTTTCAATAGAGAAACCATTACTACATCTGG  
AATAAAAAATGGAAGCTGGGATCTACTGAATGATCGTGTGCTTGGAC

**Id. de sec. nº. 16: SL04176**

CCATAGCATTTTTCATATTTATGTTAGCACAGAAACCTCTGATCCATCCATTCTCCCTATCTTTTTC  
TAATCATGAAGTTTFAGGCCTTCCATAGCTAGAATGAACAGAAAAGGTGACATGGG

**Id. de sec. nº. 17: SL08818**

AAGTGAGAAAATTTGACGGIGACGATTACGACACCTAGACTCATAAAAATACGATATGAATTGG  
AAGAGAAAACTGCCCTGGGAAGATATAAAACATGTTTTGAATCAACCAGAAGAAAAGTAAATTCTA  
CACAACACAAAATGGATCTTTAAGCTTACAA

**Id. de sec. nº. 18: SL08819**

CTGAATTGTAATTGGGTCATTTTTTCTTGAATCTCTATTCAGATATTGTTCAACTTGAACTTTT  
TTAGGTTTTGTCGTATAACCTACATTGACCCCAAATCCTGAAATAACTCAATTGAAAACGAAG  
GTGGATTATCAACAATATTGACATGTA

**Id. de sec. nº. 19: SL08821**

GTTTAAAGCTTTCAAGAAAGCTGTCTCTTGGGGACATAGGTCTCATGTGCATATTACTGGGCCT  
AGAAGTGAAGCAAATGGGAGAAAGACATCTTCATATCTCAAGAAAGATATATAAAGGAGATTTT  
GAAGTTCAACATGTTCTGCAACCTCATTAA

**Id. de sec. nº. 20: SL08822**

ATAATTAATGGCTTGAAGGAAACAGAGTAGAGAAAGGGCATTGAAACAGACCTGGTGAACTGC  
AAAACTGGAATTAATCCCAGCACCATTGACTTCTTTTCCTTGAACATATAATCTCCTGACTGAAG  
GCCCCATTCCCTTGGGACATACAGCAATC

Figura 4

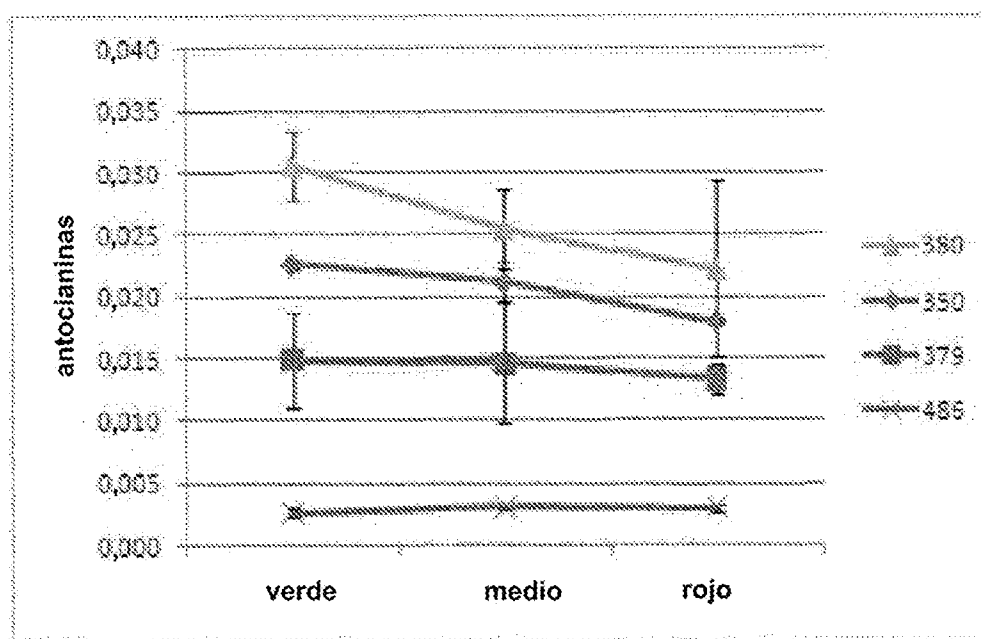
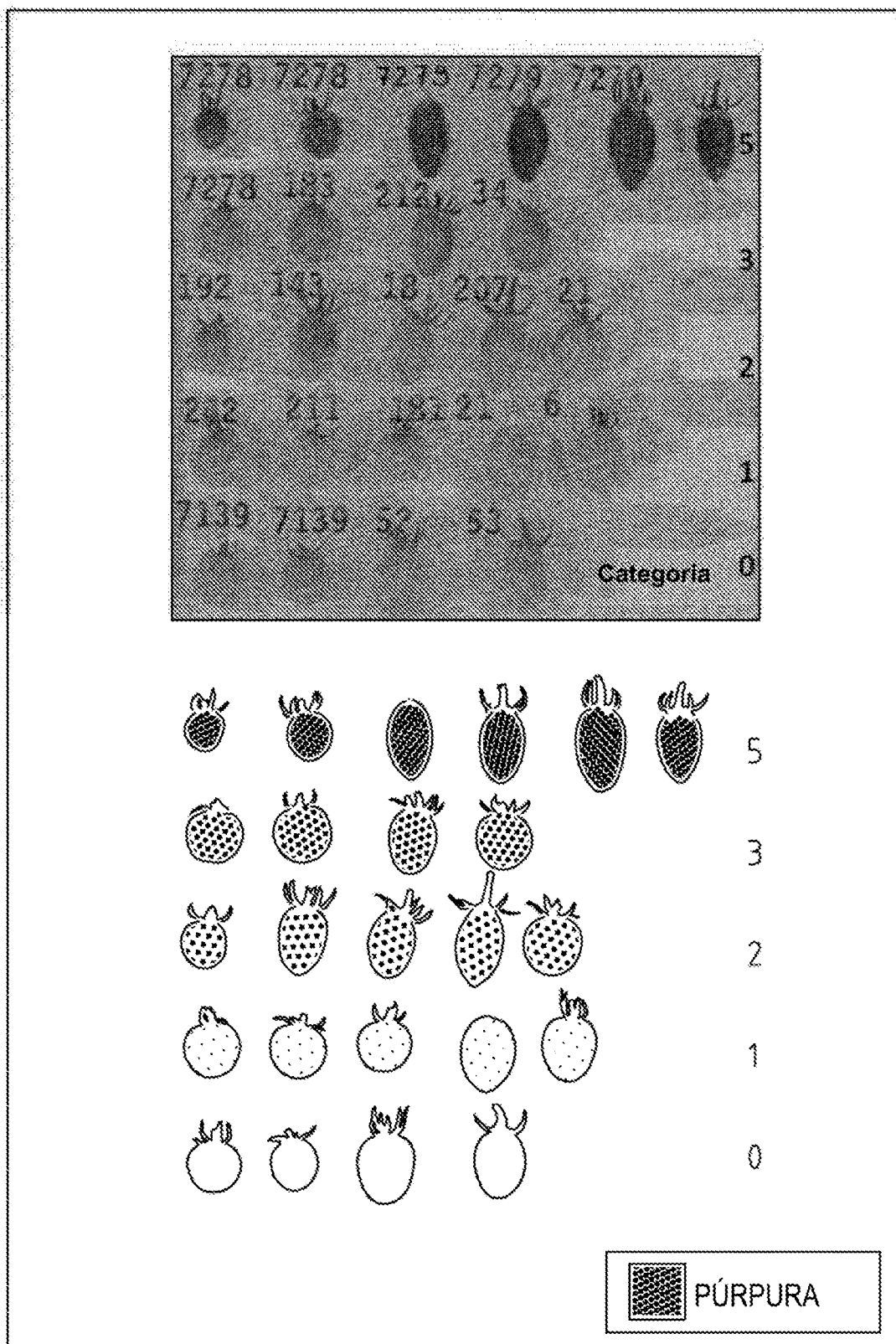


Figura 5

Referencia	Media	Grupo	Descripción visual
486	0,00291	A	verde
379	0,01429	B	púrpura claro
350	0,02063	C	púrpura medio
380	0,02607	D	púrpura oscuro



**Figura 6**

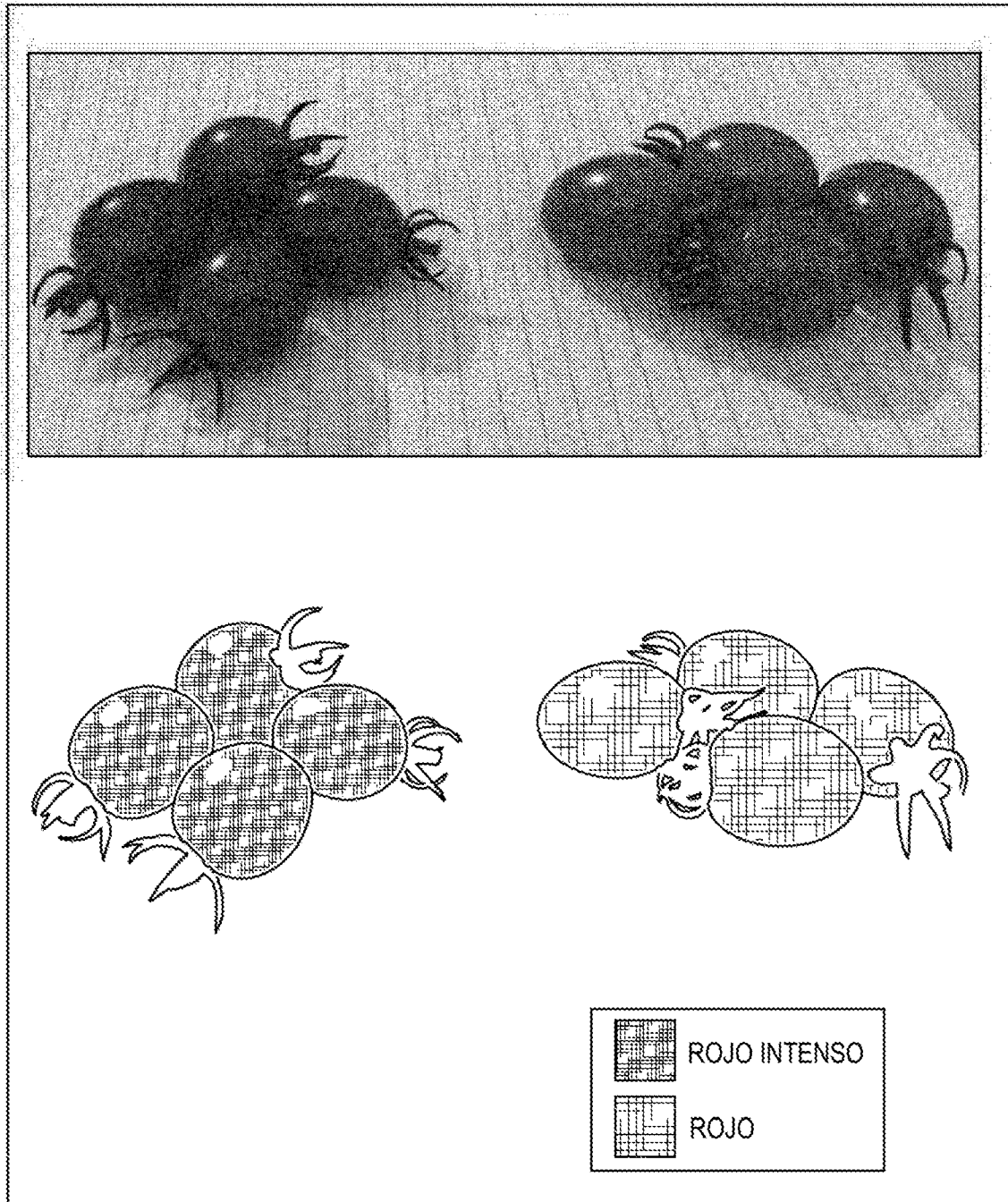


Figura 7